مجله ایمنی زیستی
دوره ۹، شماره ۱، بهار ۱۳۹۵

توالی‌یابی دی.ان.ا و شناسایی مولکول‌های زیستی توسط نانوپورها

بهنام درخشانی[1*]، خدیجه باقری[2]
۱- دانشجوی دکترا بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران
۲- استادیار دانشکده کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

Behnam.Derakhshani@yahoo.com

چکیده

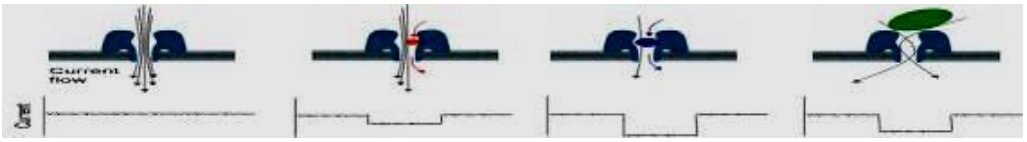
توالی‌یابی آکسفورد نانوپور، به‌عنوان تکنیک توالی‌یابی نسل سوم، از طریق تشخیص تغییرات رخ داده در جریان یونی هنگام عبور نوکلئوتیدهای دی.ان.ا از میان کانال نانوپور، به‌طور سریع و مستقیم مولکول دی.ان.ا را مورد توالی‌یابی قرار می‌دهد. به‌علاوه تکنیک فوق امکان شناسایی پروتئین‌ها، مولکول‌های miRNA و تشخیص غلظت آن‌ها در محلول مورد بررسی را دارا می‌باشد. دستگاه MinION ابداعی شرکت آکسفورد نانوپور، امکان توالی‌یابی ژنوم کامل انسان را با هزینه کمتر از ۱۰۰۰ دلار را فراهم نموده است. سرعت، دقت بالا در شناسایی تک نوکلئوتیدها و توانایی قرائت توالی‌های بلند دی.ان.ا، نانوپورها را به‌عنوان یک تکنولوژی نویدبخش در توالی‌یابی دی.ان.ا معرفی نموده است. با توجه به کمبود منابع فارسی در زمینه نامبرده و نیاز به شناخت تکنیک‌های جدید، مولفان بر آن شدند تا به ترجمه و معرفی تکنیک فوق برای استفاده توسط سایر محققین روی آورند.

کلمات کلیدی: آکسفورد نانوپور، توالی‌یابی نسل سوم، MinION، miRNA.

مقدمه

هدف اصلی نسل سوم فناوری‌های تعیین توالی، افزایش توان عملیاتی، کاهش هزینه‌ها، زمان و مواد مصرفی است. ایده اولیه استفاده از نانوپورها به‌عنوان حس‌گر زیستی، نخستین بار در سال ۱۹۹۶ در دانشگاه‌هایی همچون آکسفورد و هاروارد با تشخیص عبور دی.ان.ا دو رشته‌ای از میان کانال نانوپور و تغییر در جریان یونی حاصل پیشنهاد شد. موسسه Oxford Nanopore در سال ۲۰۰۵ توسط هیگان بیلی و سانگرا برای توسعه نانوپورها به عنوان سیستم‌های حس‌گر دی.ان.ا و سایر مولکول‌ها تاسیس شد. در طبیعت نانوپورها ایجاد کانال‌هایی در غشاء می‌نمایند. شرکت آکسفورد نانوپورها را در داخل غشاهای سنتتیک که در برابر جریان الکتریسیته مقاوم هستند قرار داده، در نتیجه جریان فقط از میان نانوپورها عبور خواهد نمود. نانوپور می‌تواند برای شناسایی یک مولکول هدف مطابق ذیل استفاده شود.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-07-17]
[DOR: 20.1001.1.27170632.1395.9.1.3.5]



شکل ۱- نانوپور پروتئینی در غشای دولایه نارسانای الکتریکی، تغییر در جریان در اثر عبور مولکول‌های مختلف از نانوپور (۱۶).

با ایجاد ولتاژ الکتریکی در عرض غشا، جریان یونی تنها از میان نانوپور عبور خواهد نمود (شکل ۱). زمانی‌که نوکلئوتیدها یا مولکول‌های دیگر مانند پروتئین‌ها، از میان کانال عبور می‌نمایند یا در نزدیکی دهانه آن قرار می‌گیرند، تغییر مشخصی در میزان جریان حاصله مشاهده می‌شود. به علل مختلف دی.ان.ا توانایی عبور از نانوپور را دارا می‌باشد. به عنوان مثال الکتروفورز می‌تواند دی.ان.ا را به سمت نانوپور هدایت نماید و باعث عبور آن شود، یا آنزیم‌های متصل به نانوپور، باعث هدایت دی.ان.ا به سمت کانال می‌شوند. در نتیجه هر نوکلئوتید باعث مسدود شدن نانوپور در مقیاسی خاص و متمایز می‌شود. در هر زمان، مقدار جریان عبوری از نانوپور، بسته به این‌که کانال توسط یک آدنین، سیتوزین، گوانین و تیمین مسدود شده باشد، متغیر خواهد بود. تغیر جریان فوق، باعث خوانش مستقیم توالی دی.ان.ا همزمان با عبور آن از میان کانال می‌شود. لازم به ذکر است که نانوپور قابلیت تشخیص انانتیومرها (۱۰) و بازهای متیله شده (۱٤) را نیز دارد.

بیلی و همکاران با استفاده از تکنیک‌های مهندسی ژنتیک و شیمی، تغییراتی در نانوپورها ایجاد نمودند که شامل:

۱- تغییر ساختار داخلی نانوپور که عبور آنالیت را از میان کانال تحت تاثیر قرار می‌دهد، مانند تغییر اسید آمینه‌ها در MspA

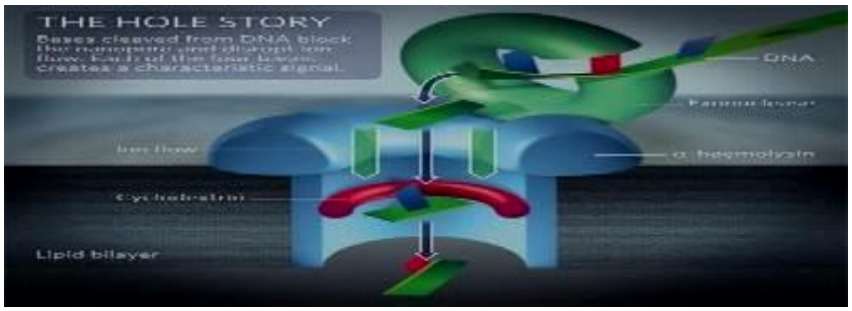
۲- اتصال یک موتور مولکولی، برای مثال یک آنزیم پروسسینگ (پلیمراز phi29) برای آنالیز پلیمرهایی همانند دی.ان.ا

۳- اتصال آپتامرها به نانوپور برای اتصال با پروتئین‌ها در خارج از کانال

به‌عنوان مثال در دهانه کانال، یک آنزیم اگزونوکلئاز قرار داده شد که با گرفتن انتهای دی.ان.ا، باعث جدا کردن هر باز و هدایت آن به داخل کانال می‌شود (شکل ۲). الحاق اگزونوکلئاز به کانال بیولوژیکی، باعث کاهش سرعت جابجایی دی.ان.ا از میان کانال شده و در نتیجه افزایش دقت اطلاعات را در پی دارد. محققان در میانه کانال، یک حلقه سیکلودکسترین قرار دادند که باعث تنگ‌تر شدن کانال می‌شود. بازها در حین عبور، بر حلقه فوق فشار آورده و فسفات‌های موجود در هر باز به‌طور موقت به سیکلودکسترین متصل شده و باعث قطع جریان می‌شوند. به‌علت این‌که بازها دارای سایزهای متفاوتی هستند، زمان قرار گرفتن در درون کانال برای هر باز متفاوت بوده و منجر به شناسایی تک بازها می‌شود (۱۸).

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-07-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1395.9.1.3.5]



شکل ۲- اگزونوکلئاز (سبز) در دهانه نانوپور آلفا همولایزین (آبی). حلقه دکسترین (قرمز) باعث تنگ‌تر شدن کانال می‌شود(۱۸).

انواع نانوپور

اساسا نانوپور یک کانال در مقیاس نانو می‌باشد که می‌تواند به‌صورت:

بیولوژیکی: از یک کانال پروتئینی تشکیل شده که در یک غشاء دولایه لیپیدی قرار گرفته است.

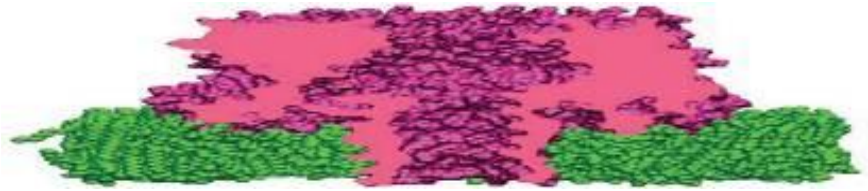
Solid-state: متشکل از مواد سنتتیک همانند سیلیکون نیترید یا گرافن می‌باشد.

هیبرید: از یک کانال پروتئینی واقع در مواد سنتتیک تشکیل شده است.

نانوپورهای بیولوژیکی

آلفا همولایزین

آلفا همولایزین (αHL)، یک پروتئین توکسین از باکتری *Staphylococcus aureus* می‌باشد که برای بیش از ۱۵ سال مورد مطالعه قرار گرفته است. باکتری آن‌را در غشای سلول میزبان قرار داده، باعث ایجاد حفره و انتشار آزادانه مولکول‌های آب، یون‌ها و مولکول‌های زیستی کوچک از عرض غشا می‌شود. در انسان، باکتری فوق باعث لیز شدن سلول‌های قرمز خون می‌شود. کانال αHL به‌صورت هپتامر، شبیه قارچ بوده (شکل ۳) و حدود صد هزار برابر باریک‌تر از تار موی انسان می‌باشد. کانال فوق با وزن ۲۳۲/٤ کیلودالتون، دارای کلاهک با قطر ۳/٦ نانومتر و قسمت زیرین با عنوان β-barrel با قطر ۲/٦ نانومتر می‌باشد. ابعاد خارجی کانال به‌صورت ۱۰nm×۱۰nm با دو بخش متمایز پنج نانومتری است. بخش بالایی بزرگ‌تر بوده، دارای ساختار تونل مانند است و بخش پایینی دارای سایت‌های شناسایی و قادر به تمایز بین بازها می‌باشد. قطر داخلی کانال در باریک‌ترین نقطه به ۱/٤ نانومتر می‌رسد که با قطر دی.ان.ا، (۱/۳ نانومتر) بسیار نزدیک می‌باشد. ساختار نانوپور تا دمای ۱۰۰°C و تغییرات pH=۲-۱۲ مقاوم است. مطالعات نشان داده که با استفاده از جریان یونی از کانال αHL، تمام چهار باز قابل شناسایی خواهند بود.



شکل ۳- تصویر جانبی از کانال αHL (قرمز) در دولایه لیپیدی (سبز) (۱۹).

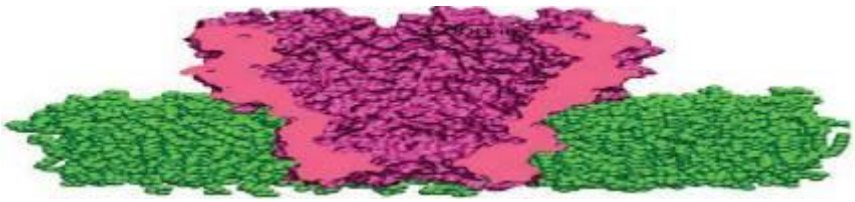
[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-07-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1395.9.1.3.5]

یک مطالعه جدید، به توانایی αHL در شناسایی بازها توسط دو سایت مجزا واقع در بخش پایینی کانال اشاره دارد (۲۰). سایت‌های R1 و R2، باعث شناسایی هر باز عبوری در دو مرحله شده، در نتیجه باعث ایجاد ۱٦ جریان یونی متمایز به‌جای چهار جریان می‌شوند.

MspA

دومین نانوپور بیولوژیکی مورد استفاده، (MspA) *Mycobacterium smegmatis* porin A می‌باشد. کانال MspA به علت ساختار بهتر، بر αHL برتری دارد (۱٤). کانال نامبرده دارای ساختار جام مانند به‌صورت اکتامر، با یک دیواره ضخیم و قطر ۱ نانومتر در باریک‌ترین نقطه کانال می‌باشد (شکل ٤). به‌علاوه کانال فوق در شرایط حاد مانند تغییرات pH=۰-۱٤ و دمای ۱۰۰°C برای ۳۰ دقیقه مقاوم می‌باشد (٦). کانال مذکور به علت شکل و قطر خاص، برای توالی‌یابی دی.ان.ا مطلوب بوده، اما به دلیل وجود هسته با بار منفی، از جابجایی دی.ان.ای تک رشته ممانعت می‌نماید. از طریق جایگزینی سه آسپاراتیک اسید دارای بار منفی، با سه آسپاراژین خنثی، ساختار MspA برای جابجایی دی.ان.ا اصلاح شد. همچنین ۲٤ اسید آمینه با بار مثبت، در دهانه و میانه کانال برای تسریع ورود دی.ان.ا اضافه شد (۳). به‌علاوه نشان داده شد که نانوپور MspA، قادر به توالی‌یابی دقیق ژنوم phi X 174 تا طول ٥٤۰۰ باز می‌باشد (۱۱).

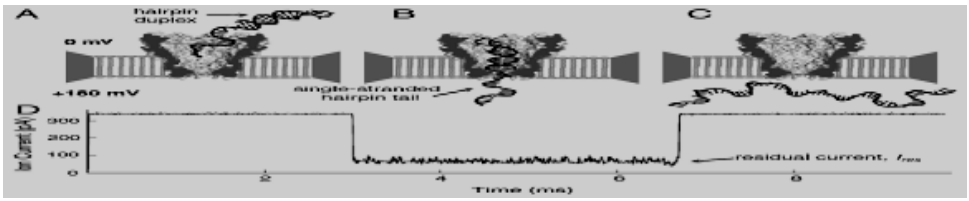


شکل ٤- تصویر جانبی کانال MspA (قرمز) در دولایه لیپیدی (سبز) (۱۹).

توانایی شناسایی جریان الکتریکی مربوط به نوکلئوتیدها، در MspA تا ده برابر اختصاصی‌تر از αHL می‌باشد. گروهی در دانشگاه واشینگتن پیشنهاد نمودند که برای نگه‌داری هر باز در محل قرائت کانال، از دی.ان.ا دو رشته در بین هر مولکول تک رشته هدف استفاده شود (۳و ۱٤). در نتیجه دی.ان.ای دو رشته، باعث متوقف شدن باز در کانال شده و شناسایی نوکلئوتید را در پی خواهد داشت. روش دیگر استفاده از دنباله سنجاق سر می‌باشد (شکل ٥). بدین صورت که با اعمال ولتاژ ۱۸۰mV در کانال، ناحیه تک‌رشته دی.ان.ا، در دهانه کانال قرار می‌گیرد. در ادامه ناحیه سنجاق سر دورشته، بعد از ۱۰ میلی‌ثانیه به صورت تک رشته درآمده و باعث عبور کامل دی.ان.ا از کانال می‌شود. در طول زمان گیر افتادن دنباله سنجاق سر، جریان یونی به توالی دی.ان.ای تک رشته درون کانال بستگی دارد (٤).

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-07-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1395.9.1.3.5]



شکل۵ – استفاده از ناحیه سنجاق سر برای کاهش سرعت عبور دی.ان.ای تک رشته از کانال MspA (٤).

آنزیم دی.ان.ا پلیمراز phi29

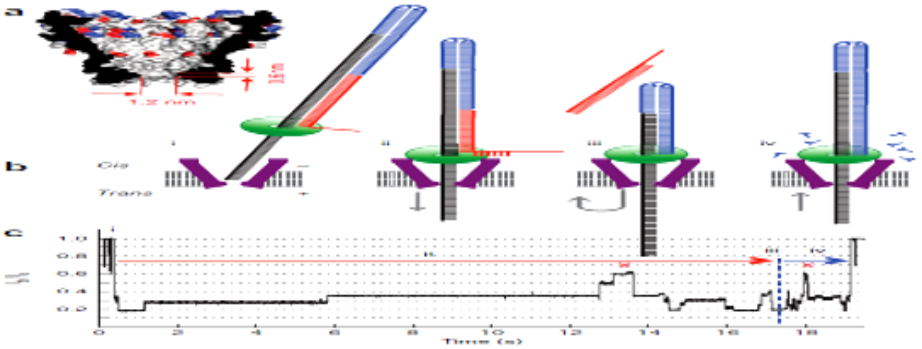
نانوپور بیولوژیکی دیگری با منشا phi29 Bacteriophage توجه بسیاری را به‌خود جلب نموده است. کانال نامبرده در طیفی از تغییرات ولتاژ بین ۱۵۰mV– تا ۱۵۰ mV+ و طیف وسیعی از تغییرات pH مقاوم می‌باشد (۸). آنزیم مونومر فوق با وزن ٦٦/٥KD دارای خاصیت پلیمرازی ′۳–′۵ وابسته به آغازگر، خاصیت اگزونوکلئازی ′۵–′۳ هر دو در حضور Mg^{2+} بوده، همچنین خاصیت جایگزینی رشته با فعالیت ′۳–′۵ دارد (۱۷). اخیرا از پلیمراز فوق در ترکیب با کانال نانوپور برای شناسایی تک نوکلئوتیدها استفاده به عمل آمده است. هر دو فعالیت پلیمرازی و اگزونوکلئازی، باعث عبور تک نوکلئوتیدهای دی.ان.ا از میان کانال شده و باعث کنترل سرعت جابجایی می‌شود. در یک تکنیک جدید، پلیمراز phi29 در ترکیب با دی.ان.ای الگو و یک الیگومر مسدود کننده قرار گرفت (۱۳)، که از بسط یا حذف شدن آغازگر در انتهای ′۳، دی.ان.ا الگو ممانعت به عمل می‌آورد (شکل ٦). انتهای تک رشته کمپلکس دی.ان.ا–phi29 درون کانال قرار گرفته و منجر به مستقر شدن پلیمراز فوق در دهانه کانال می‌شود. نیروی حاصل از عبور جریان الکتریکی، باعث جدا شدن (unzipping) الیگومر در جهت ′۳ به ′۵ و نمایان شدن انتهای ′۳ آغازگر و شروع سنتز رشته مکمل می‌شود. یک کانال MspA در دو لایه لیپیدی قرار گرفته و باعث جدا شدن دو محفظه سیس و ترانس می‌شود. در تمام آزمایش‌ها، دی.ان.ا با طول ۹۱–۸۰ نوکلئوتید شامل ناحیه هدف برای توالی‌یابی با یک آغازگر با طول ۲۳nt، مکمل انتهای ′۳ هیبرید شد. آغازگر فوق دارای ساختار سنجاق سر در انتهای ′۵ خود برای ممانعت از عمل پلیمراز phi29 در انتهای دیگر خود می‌باشد. در ناحیه مجاور آغازگر، یک الیگومر مسدود کننده ۱۵ تا ۲۹ نوکلئوتیدی و با انتهای ′۳ دارای دنباله (abasic) هفت‌تایی قرار داده شد.

به‌عبارت دیگر، هر رشته دی.ان.ا در مجموع دو بار مورد توالی‌یابی قرار می‌گیرد. نخست در طول جدا شدن الیگومر و حرکت دی.ان.ا از سمت محفظه سیس و مرحله بعد با برگشت دی.ان.ا از سمت ترانس و در حین سنتز توسط پلیمراز phi29 اتفاق می‌افتد. پس از کامل شدن مراحل سنتز دی.ان.ا، پلیمراز phi29 و رشته دی.ان.ا هر دو در محفظه سیس آزاد می‌شوند.

کار مشابهی با استفاده از نانوپور αHL و پلیمراز phi29 به انجام رسید. دقت آزمایش فوق در خوانش تک نوکلئوتیدها کمتر از MspA گزارش شد (۵).

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-07-17]

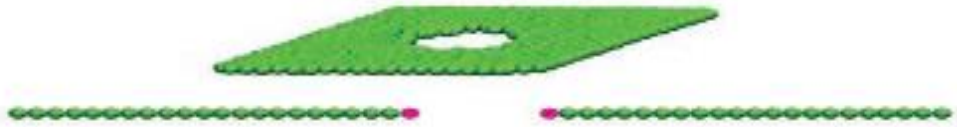
[DOR: 20.1001.1.27170632.1395.9.1.3.5]



شکل ٦– (a) ساختار کریستالی MspA. دنباله‌های باردار آبی (منفی) یا قرمز (مثبت). (b) اعداد لاتین نشان‌دهنده مراحل آزمایش می‌باشند. (c) جریان اندازه‌گیری شده در مراحل مختلف. (i) یک کانال MspA (بنفش) در دو لایه لیپیدی (خاکستری). رشته الگو (سیاه) دارای توالی هدف برای خوانش. آغازگر (آبی) هیبرید شده به انتهای ′۳ رشته الگو. الیگومر مسدود کننده (قرمز) مجاور آغازگر دارای هفت سایت abasic در انتهای ′۳ خود می‌باشد. پلیمراز phi29 (سبز) به دی.ان.ا متصل شده و تشکیل کمپلکس هدایت شونده به سمت MspA را می‌دهد. ولتاژ با بار مثبت به سمت محفظه ترانس اعمال میشود. انتهای ′۵ تک رشته دی.ان.ا، درون MspA قرار گرفته و جریان یونی کاهش می‌یابد. (ii) نیروی الکتریکی باعث رانده شدن دی.ان.ا به سمت phi29 و جدا شدن الیگومر مسدودکننده می‌شود. پیکان‌ها نشان‌دهنده جهت حرکت دی.ان.ا می‌باشند. (iii) الیگومر جدا شده و جهت حرکت دی.ان.ا معکوس می‌شود (نشان داده شده با خط آبی). (iv) پلیمراز phi29 با اضافه کردن نوکلئوتیدها به انتهای آغازگر باعث رانده شدن دی.ان.ا به سمت سیس می‌شود. سایت‌های abasic باعث ایجاد جریان بیشتر ($۰/٦ I_o$) شده و با پیکان Xs قرمز نشان داده شده‌اند. نشانگرهای فوق نخست در مرحله unzipping و سپس در مرحله سنتز مشاهده شد (۱۳).

نانوپورهای Solid state

نسل بعدی نانوپورها، تمایل به استفاده از مواد سنتتیک (solid state) دارند که باعث کاهش قیمت و بهبود کیفیت آنالیز خواهند شد. نانوپور solid state معمولا کانالی در حد نانومتر می‌باشد که در غشاء سنتتیک (معمولا Si_3N_4 یا SiO_2) مستقر شده است (٦). در حال حاضر نانوپورهای solid state فاقد دقت نانوپورهای پروتئینی می‌باشند. روش تحت بررسی، ترکیب کانال پروتئینی در غشاء solid state می‌باشد. ردیاب‌های گرافنی جزء بهترین حس‌گرها هستند. گرافن شبکه لانه زنبوری از جنس کربن، با ضخامت یک اتم کربن می‌باشد که هدایت الکتریکی بالایی دارد (شکل ۷). خصوصیات فوق، گرافن را به ماده مناسبی برای توالی‌یابی دی.ان.ا با قدرت تفکیک بالا تبدیل نموده است (۱۵). در سال ۲۰۱۰ جایزه نوبل فیزیک به پروفسور آندره گیم و کنستانتین نووسلو از دانشگاه منچستر در انگلستان برای کشف خصوصیات گرافن اهدا شد. در حال حاضر تحقیقات بر روی گرافن برای توالی‌یابی دی.ان.ا با دقت یک نوکلئوتید ادامه دارد.



شکل ۷– ساختار گرافن، دوایر سبز اتم‌های کربن و دوایر قرمز کربن‌های واقع در دهانه نانوپور می‌باشند (۱۹).

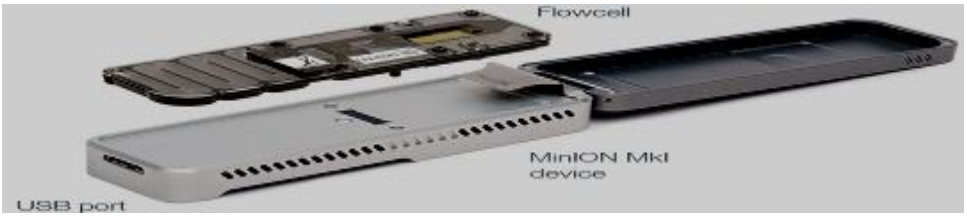
[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-07-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1395.9.1.3.5]

توالی‌یابی دی.ان.ا توسط نانوپورها

توالی‌یابی دی.ان.ا نخستین برنامه کاربردی در سیستم Oxford Nanopore بوده و از طریق سیستم‌های MinION، PromethION و GridION قابل انجام می‌باشد. توالی‌یابی، تکنیکی است که پلیمرهای دی.ان.ا را از میان کانال پروتئینی نانوپور عبور داده و همراه با عبور دی.ان.ا به‌صورت real time، توالی‌یابی را انجام می‌دهد. بدین‌صورت که یک جریان یونی از میان نانوپورها عبور داده می‌شود و تغییرات در جریان، با عبور مولکول‌های بیولوژیکی از میان کانال یا نزدیک آن اندازه‌گیری می‌شود و اطلاعات مربوط به تغییر جریان می‌تواند برای شناسایی مولکول‌ها استفاده شود (١٦).

از ژوئن ٢٠١٤ ابزار MinION توسط تعداد زیادی از پژوهشگران مورد استفاده قرار گرفته است (شکل ٨). مقالات بسیاری از ابزار فوق برای شناسایی سریع پاتوژن‌های ویروسی (٧)، مانیتورینگ ابولا (Anonymous)، مقاومت به آنتی‌بیوتیک (٢)، هاپلوتایپینگ (١) و سایر موارد استفاده نموده‌اند. دستگاه فوق، کمی بزرگتر از فلش USB بوده از طریق کابل USB به کامپیوتر متصل شده و به آسانی قابلیت جابجایی دارد. ابزار MinION دارای یک Flow cell با صدها کانال می‌باشد که باعث انجام چندین آنالیز توسط نانوپورها به طور همزمان و موازی می‌شود. کانال‌ها در یک چیپ بنام ASIC (Application Specific Integrated Circuit) قرار داده شده‌اند. در سال ٢٠١٤، میانگین قرائت توالی توسط MinION حدود ١٠kb-٥/٤ اعلام شده است (٦) و بدین‌صورت بر مشکل قرائت رشته‌های کوتاه توسط سایر سیستم‌ها فائق آمده است. به عنوان مثال توالی‌یابی دی.ان.ا فاژ Phi X 174 با طول ٥/٤ کیلوباز در طی یک بارگذاری قابل انجام می‌باشد.



شکل ٨- MinION همراه با flow cell (١٦).

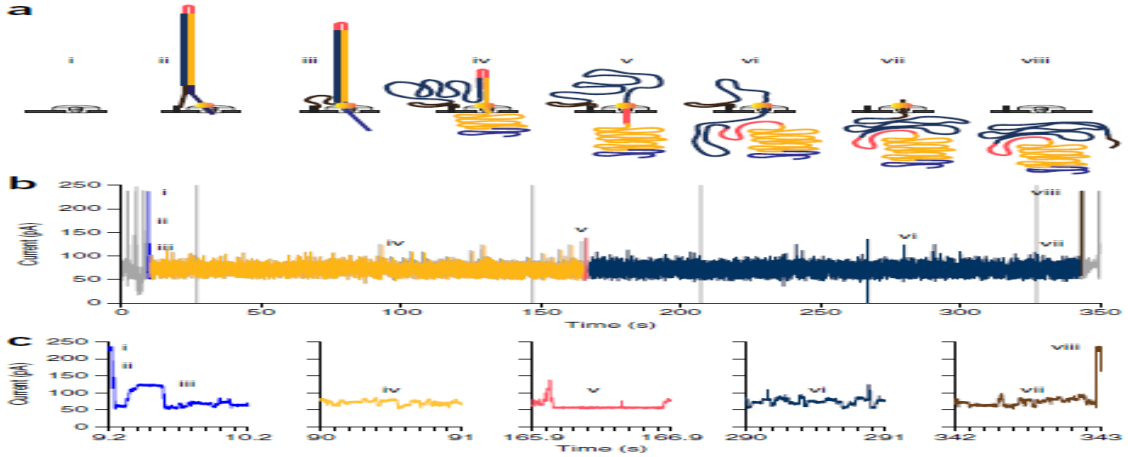
MinION توانایی تشخیص حذف و درج‌شدگی‌ها، تغییرات پس از ترجمه مانند متیلاسیون دی.ان.ا و حتی تشکیل دایمرهای تیمین را دارد (٩). دستگاه MinION توالی تک‌رشته دی.ان.ا را با عبور از میان نانوپورهای بیولوژیکی قرائت می‌نماید. سرعت عبور دی.ان.ا از نانوپور توسط آنزیم پروسسینگ در دهانه کانال کنترل می‌شود. تعداد مولکول دی.ان.ا که قابلیت قرائت همزمان و مستقل توسط نانوپورها در MinION را دارند، تا ٥١٢ مولکول گزارش شده است (٩). عبور تک نوکلئوتیدهای دی.ان.ا، از میان کانال باعث تغییر در جریان یونی می‌شود. سپس نرم افزار Metrichor که توسط شرکت آکسفورد ابداع شده است با استفاده از مدل Markov، تغییرات در جریان را به بازهای دی.ان.ا ترجمه می‌نماید.

جین و همکاران (٢٠١٥) ژنوم فاژ M13mp18 با اندازه ٧/٢kb، را به صورت دو رشته درآورده و توسط

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-07-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1395.9.1.3.5]

MinION مورد توالی‌یابی قرار دادند (شکل ۹). سازه دی.ان.ای فوق شامل یک آداپتور در ابتدای رشته الگو است که باعث تسهیل گیر افتادن دی.ان.ا توسط آنزیم در دهانه نانوپور می‌شود. سپس دی.ان.ای الگو، یک آداپتور سنجاق سر که باعث خوانش پشت سر هم هر دو رشته الگو و مکمل (2-Directional sequencing) شده و آداپتور دیگر در انتهای رشته مکمل می‌باشد. عبور هر کدام از رشته‌های نامبرده از کانال، منجر به جریان متمایز خواهد شد. برای تعیین توالی دی.ان.ا، یک نمونه نیمه هضم شده در چیپ بارگذاری شده و رشته‌های با طول متفاوت توسط کانال‌های مختلف مورد توالی‌یابی قرار می‌گیرند.

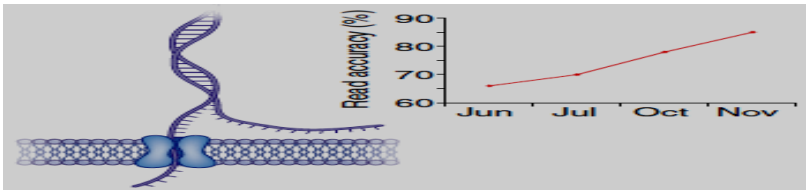


شکل ۹- وقایع مولکولی و جریان یونی برای قرائت 2D مولکول دی.ان.ای دو رشته فاژ M13. (a) مراحل عبور دی.ان.ا از میان نانوپور: (i) کانال باز، (ii) دی.ان.ای دو رشته همراه با آداپتور آغازین (آبی)، موتور مولکولی (نارنجی) و آداپتور سنجاق سر (قرمز) گیرافتاده توسط نانوپور، گیرافتادن توسط جابجایی (iii) آداپتور آغازین رخ می‌دهد، (iv) رشته الگو (طلایی)، (v) آداپتور سنجاق سر، (vi) رشته مکمل (آبی تیره) و (vii) آداپتور انتهایی (قهوه‌ای)، (viii) برگشت به حالت کانال باز. (b) ترسیم جریان اولیه ناشی از عبور دی.ان.ای دو رشته فاژ M13 از نانوپور. نواحی مطابق با هر مرحله دارای رنگ متفاوت می‌باشد. (c) توسعه جریان و زمان برای هر مرحله i-viii. هر آداپتور با ایجاد جریان متمایز به نام‌گذاری بازها کمک می‌نماید، (۹).

در طول شش ماه استفاده از برنامه کاربردیMAP (MinION Application Program)، سه نسخه از دستگاه MinION و الگوریتم‌های متعددی به‌روزرسانی شده‌اند. میانگین دقت در قرائت‌های 2D در ژوئن ۲۰۱٤ برابر ٦٦درصد، در جولای ۲۰۱٤ برابر ۷۰ درصد، در اکتبر ۲۰۱٤ برابر ۷۸ درصد و در نوامبر ۲۰۱٤ برابر ۸۵ درصد گزارش شده است (شکل ۱۰). به عبارت دیگر در طول شش ماه، بهبود سریعی در دقت توالی‌یابی توسط MinION رخ داد. به نحوی که دقت خوانش دو رشته دی.ان.ا به میزان ۲۵ درصد افزایش یافت (۱۲).

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-07-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1395.9.1.3.5]



شکل ۱۰– بهبود سریع در دقت قرائت دو رشته توسط نانوپور MinION در ماه‌های سال ۲۰۱٤ (۱۲).

در حال حاضر یک تیم تحقیقاتی در گینه از دستگاه فوق برای توالی‌یابی Ebola استفاده می‌نمایند. شایان ذکر است که زمان آنالیز برای هر بیمار مدت ۱۵ دقیقه به طول می‌انجامد. شرکت آکسفورد در حال طراحی نسخه ویژه‌ای از MinION می‌باشد که قابلیت استفاده توسط تلفن همراه را خواهد داشت.

برای قرائت‌های بلندتر، سیستم GridION توسعه یافته است (شکل ۱۱). سیستم فوق برای انجام آنالیز از چند دقیقه تا چند روز قابل تنظیم بوده، نسبت به MinION دارای عملکرد بالاتر، تعداد کانال بیشتر، زمان انجام طولانی‌تر و هزینه پایین‌تر نسبت به هر باز می‌باشد. بر مبنای گزارش شرکت می‌توان با استفاده از ۲۰ ابزار GridION یا node به طور موازی ژنوم انسان را در ۱۵ دقیقه و با هزینه کمتر از ۱۰ دلار به ازای هر گیگا باز آنالیز نمود.

شکل ۱۱– دستگاه GridION (۱٦).

شرکت آکسفورد با ایجاد تجهیزات الکترونیکی، انجام صدها هزار آزمایش تشخیصی همزمان، همراه با جمع‌آوری اطلاعات و آنالیز real time داده‌ها را امکان پذیر نموده است. ویژگی اساسی ابزارهای MinION، PromethION و GridION، عدم وجود زمان ثابت برای انجام آزمایش می‌باشد به‌طوری‌که پژوهشگر می‌تواند سیستم را برای زمان دلخواه تا رسیدن به نتیجه مورد نظر ادامه دهد.

در طول انجام آزمایش، هر نانوپور موجود در چیپ به‌طور جداگانه، مولکول‌ها را مورد آنالیز قرار می‌دهد. به‌عنوان مثال برای یک مولکول پروتئینی در حد میلی ثانیه و برای پلیمرهایی مانند دی.ان.ا بسته به طول رشته، زمان عبور از کانال و قرائت کامل از میلی‌ثانیه تا چند ثانیه به‌طول می‌انجامد. در طول انجام آنالیز، هر نانوپور چندین مولکول موجود در محلول اطراف خود را مورد آنالیز قرار می‌دهد و باعث ارائه اطلاعات می‌شود. آنالیز اطلاعات به‌طور real time و همزمان با جریان اطلاعات از چیپ و نانوپورها صورت می‌گیرد. در عین حال، ادامه آزمایش برای مدت بیشتر باعث

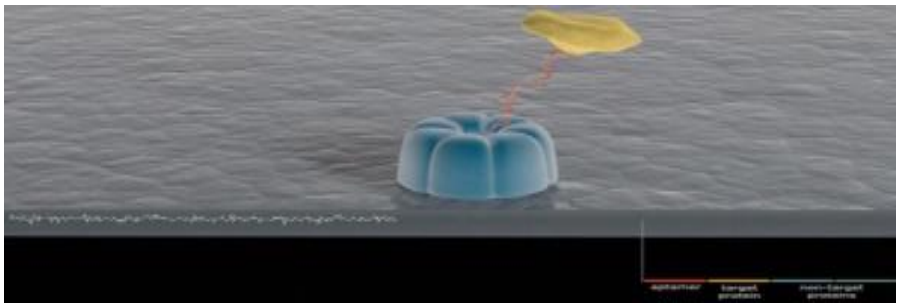
[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-07-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1395.9.1.3.5]

جمع‌آوری اطلاعات بیشتر، اطمینان بالاتر از نتایج حاصله و اندازه‌گیری دقیق‌تر خواهد شد. در مورد توالی‌یابی دی.ان.ا، تا زمانی‌که توالی اختصاصی ده‌ها بار مورد قرائت قرار گیرد، یک جهش اختصاصی شناسایی شود و اطلاعات کافی از نمونه اخذ شود، آنالیز می‌تواند ادامه داشته باشد. در مورد آنالیز پروتئین، تا زمان تشخیص با درجه اطمینان بالا و تعیین غلظت نمونه، آنالیز انجام می‌شود. در واقع در سیستم‌های قدیمی، پژوهشگر مجبور بود تا آزمایش را مطابق با دستگاه تنظیم نماید، اما در سیستم اکسفورد به نوعی پژوهشگر به سیستم دستور می‌دهد تا خروجی اطلاعات را مانیتور نموده و نتایج مورد نظر را ارائه نماید.

آنالیز پروتئین توسط نانوپور

روش مستقیم آنالیز پروتئین توسط نانوپورها، دارای اختصاصیت و حساسیت بالا می‌باشد. شرکت Oxford در حال توسعه تکنیک‌های آنالیز الکترونیکی مستقیم پروتئین‌ها با تلفیق نانوپورها و آپتامرها می‌باشد. آپتامر یک الیگونوکلئوتید با توانایی اتصال به ناحیه خاص در پروتئین هدف است. در تکنولوژی فوق، اتصال کمپلکس پروتئین-آپتامر، باعث قطع جریان از میان کانال می‌شود (شکل ۱۲). آپتامر مانند یک دنباله الیگونوکلئوتیدی به پروتئین اختصاصی متصل شده و با عبور از میان نانوپور، پروتئین را در اتصال با دهانه نانوپور قرار می‌دهد (پروتئین قابلیت عبور از کانال را ندارد)، سپس آپتامر از پروتئین جدا شده از میان نانوپور عبور کرده، و تغییر جریان باعث شناسایی آپتامر و پروتئین مربوطه می‌شود. گاهی آپتامرهای انفرادی، بدون اتصال به پروتئین از میان نانوپور عبور می‌نمایند که باعث قطع جریان به مدت کوتاه‌تر می‌شوند که قابل تشخیص می‌باشند. پروتئین‌های متصل نشده با آپتامرها، توسط نانوپورها شناسایی نمی‌شوند. فراوانی اتصال با آپتامر باعث تشخیص غلظت پروتئین می‌شود. آنالیز پروتئینی فوق با دستگاه‌های MinION، PromethION و سیستم GridION قابل انجام می‌باشد.



شکل ۱۲– اتصال اپتامر (قرمز) به پروتئین هدف (زرد)، و نانوپور (آبی) (۱۶).

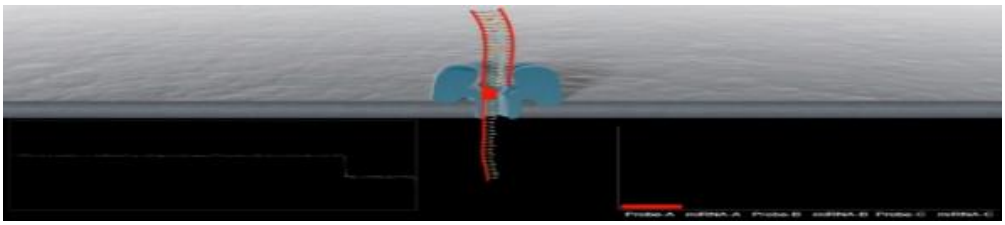
آنالیز MicroRNA توسط نانوپور

miRNAs در واقع آر.ان.اهای کوتاه (با طول ۲۰ تا ۲۵ نوکلئوتید) می‌باشند. بیان آن‌ها در بیماری‌های مختلف مانند عفونت باکتریایی، سرطان و دیابت تغییر می‌یابد، که باعث استفاده از miRNA به عنوان نشانگر زیستی برای کارهای تشخیصی سریع و دقیق می‌شود. شرکت آکسفورد، از ویژگی نانوپورها برای تشخیص مستقیم miRNAها استفاده نموده است. شرکت فوق

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-07-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1395.9.1.3.5]

کاوشگرهای اختصاصی miRNA طراحی نموده که بخشی از کاوشگر، مکمل توالی miRNA بوده، سپس یک ناحیه دارای بار کد قرار دارد و پس از آن ناحیه تک رشته می‌باشد (شکل ۱۳). در اثر اتصال کاوشگر با miRNA، انتهای تک رشته کاوشگر داخل کانال قرار گرفته، اما بخش دو رشته (duplex)، به‌طور موقت از جابجایی کمپلکس کاوشگر-miRNA از میان کانال ممانعت می‌نماید. بدین‌ترتیب دهانه نانوپور مسدود گشته و جریان عبوری به طور اختصاصی متوقف می‌شود. بارکد موجود در ناحیه تک رشته کاوشگر، داخل کانال قرار گرفته، در حین توقف دوپلکس، با ایجاد سیگنال خاص باعث شناسایی کاوشگر می‌شود. سپس کاوشگر از miRNA جدا شده و miRNA تک رشته با عبور از میان کانال با ایجاد سیگنال اختصاصی مورد شناسایی قرار می‌گیرد.



شکل ۱۳- رشته کاوشگر (بلند) دارای بارکد (برجسته) در داخل کانال که با **miRNA** هیبرید شده و باعث تغییر جریان می‌شود (۱۶).

miRNAهای مختلف، توسط کاوشگرهای مختلف هیبرید شده و سیگنال اختصاصی ایجاد می‌نمایند که باعث تشخیص اختصاصی miRNAها و همچنین غلظت آن‌ها می‌شوند. اگر کاوشگر تک‌رشته از میان کانال عبور نماید، باعث ایجاد سیگنال متفاوتی می‌شود که از روی آن می‌توان غلظت miRNAهای موجود در نمونه را تشخیص داد. همچنین miRNAی تک‌رشته از میان کانال بدون ایجاد سیگنال خاص عبور می‌نماید. تکنیک فوق باعث شناسایی الکترونیکی miRNAها با اختصاصیت و حساسیت بالا و به‌صورت real time می‌شود. همچنین بارکدهای متصل به کاوشگر باعث شناسایی miRNAها در نمونه‌هایی همچون سرم یا خون می‌شوند.

مزایا

مزیت سیستم نانوپور، در عدم نیاز به تکثیر یا کلون کردن دی.ان.ا، عدم نیاز به تگ فلورسنت و حداقل آماده‌سازی نمونه می‌باشد. به علاوه همراه با توالی‌یابی مستقیم دی.ان.ا ژنومی و شناسایی چهار باز، امکان تشخیص بازهای تغییر یافته مانند ۵-متیل سیتوزین نیز وجود دارد. تکنیک فوق انعطاف‌پذیری بالایی دارد، به‌طوری‌که از آن برای کشف وجود حیات در سایر سیارات از طریق شناسایی حامل‌های اطلاعات ژنتیکی غیر از دی.ان.ا استفاده شده است. سیستم Oxford Nanopore، برای آنالیز هر موجود زنده و در هر محیطی طراحی شده است. پژوهشگران با استفاده از سیستم فوق قادر به آنالیز ژنتیکی طیف وسیعی از موجودات شامل انسان، دام، گونه‌های در معرض انقراض، غلات، قارچ، باکتری، ویروس و ... می‌باشند.

چالش‌ها

یکی از مهمترین مسائل سرعت جابجایی دی.ان.ا (۳-

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-07-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1395.9.1.3.5]

۱ مایکرو ثانیه/ باز) می‌باشد که شناسایی تک نوکلئوتیدها را با محدودیت مواجه می‌نماید. در سال‌های گذشته، استراتژی‌های مختلفی برای کاهش سرعت جابجایی دی.ان.ا اعمال شده است. همچنین بهینه‌سازی شرایط فیزیکی آزمایش مانند کاهش ولتاژ، کاهش دمای محلول، افزایش ویسکوزیته و افزایش غلظت نمک، برای کنترل سرعت جابجایی دی.ان.ا موفق بوده‌اند. روش جدید ارائه شده توسط مانرائو و همکاران (۲۰۱۲) برای توالی‌یابی دی.ان.ای تک‌رشته با وضوح یک نوکلئوتید با استفاده از MspA جهش یافته و دی.ان.ا پلیمراز phi29 موفق عمل نمود.

نتیجه‌گیری

تکنولوژی نانوپورها برای شناسایی و کمیت سنجی طیف وسیعی از مولکول‌ها مورد استفاده قرار گرفته است. به‌عنوان تکنیک توالی‌یابی نسل سوم، نانوپورها توانایی تبدیل شدن به تکنولوژی سریع، بدون نشانگر و با هزینه پایین توالی‌یابی دی.ان.ا را داشته، به‌طوری‌که توالی‌یابی ژنوم انسان با هزینه ۱۰۰۰ دلار قابل انجام شود. همچنین نانوپورها دارای مزایایی از قبیل کمترین میزان آماده‌سازی نمونه، عدم نیاز به تکثیر و تغییر در نوکلئوتیدها، پلیمرازها یا لیگازها بوده و دارای قرائت بلند (۱۰۰۰۰–۵۰۰۰۰ باز) می‌باشند.

فهرست منابع

References

1- **Ammar R., Paton T.A., Torti D., Shlien A. and Bader G.D. (2015).** Long read nanopore sequencing for detection of HLA and CYP2D6 variants and haplotypes [v2; ref status: indexed, http://f1000r.es/5ev] F1000Research. 4:17.

2- **Ashton P.M., Nair S., Dallman T., Rubino S., Rabsch W., Mwaigwisya S., wain J. and O'Grady J. (2014).** MinION nanopore sequencing identifies the position and structure of a bacterial antibiotic resistance island. Nature Biotechnology. 33: 296-300.

3- **Butler T.Z., Pavlenok M., Derrington I., Niederweis M. and Gundlach J. (2008).** Single-molecule DNA detection with an engineered MspA protein nanopore. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106 9: 20647–20652.

4- **Derrington I.M. *et al.* (2010).** Nanopore DNA sequencing with MspA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107: 16060–16065.

5- **Cherf G., Lieberman K., Rashid H., Lam C., Karplus K. and Akeson M. (2012).** Automated forward and reverse ratcheting of DNA in a nanopore at 5-Å precision. Nat Biotechnol. 30: 344–8.

6- **Feng Y., Zhang Y., Ying C., Wang D. and Du C. (2015).** Nanopore-based Fourth-generation DNA Sequencing Technology. Genomics, Proteomics & Bioinformatics. 13(1): 4–16.

7- **Greninger, A.L., Naccache S.N., Federman S. *et al.* (2015).** Rapid metagenomic identification of viral pathogens in clinical samples by real-time nanopore sequencing analysis. bioRXiv.

8- **Haque F. and Guo P. (2011).** Membrane-embedded channel of bacteriophage phi29 DNA-packaging motor for translocation and sensing of double-stranded DNA. In: Iqbal SM, Bashir R, editors. Nanopores. New York: Springer US; p. 77–106.

9- **Jain M., Fiddes I.T., Miga K.H., Olsen H.E., Paten B. and Akeson M. (2015).** Improved data analysis for the MinION nanopore sequencer. Nature Methods. 12: 351-356.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-07-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1395.9.1.3.5]

10- Kang X.F., Cheley S., Guan X.Y. and Bayley H. (2006). Stochastic detection of enantiomers. J Am Chem Soc. 128: 10684–5.

11- Laszlo A.H., Derrington I.M., Ross B.C., Brinkerhoff H., Adey A., Nova I.C. *et al*. (2014). Decoding long nanopore sequencing reads of natural DNA. Nat Biotechnol. 32: 829–33.

12- Loman N.J. and Watson M. (2015). Successful test launch for nanopore sequencing. Nature Methods. 12(4): 303-304.

13- Manrao E.A., Derrington I.M., Laszlo A.H., Langford K.W., Hopper M.K., Gillgren N. *et al*. (2012). Reading DNA at single-nucleotide resolution with a mutant MspA nanopore and phi29 DNA polymerase. Nat Biotechnol. 30: 349–53.

14- Manrao E., Derrington I., Pavlenok M., Niederweis M. and Gundlach J. (2011). Nucleotide discrimination with DNA immobilized in the MspA nanopore. PLoS ONE. 6: 10.

15- Merchant C.A., Healy K., Wanunu M., Ray V., Peterman N., Bartel J. *et al*. (2010). DNA translocation through graphene nanopores. Nano Lett. 10: 2915–21.

16- Oxford Nanopore Technologes. Available at https://www.nanoporetech.com/.

17- Salas M., Blanco L., Lazaro J.M. and de Vega M. (2008). The bacteriophage phi29 DNA polymerase. IUBMB Life. 60: 82–85.

18- Sanderson K. (2008). Could the next generation of genetic sequencing machines be built from a collection of minuscule holes? Nature. 456: 23-25.

19- Schneider G.F. and Dekker C. (2012). DNA sequencing with nanopores. Nat Biotechnol. 30: 326-328.

20- Stoddart D., Maglia G., Mikhailova E., Heron A.J. and Baylay H. (2010). Multiple base-recognition sites in a biological nanopore – two heads are better than one. Angewandte Chemie. 49(3): 556-559.

DNA sequencing and detection of bio molecules with Nanopores

Behnam Derakhshani*[1], Khadijeh Bagheri[2]

1- PhD student of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Zanjan University, Zanjan, Iran

2- Assistant Professor, Faculty of Agriculture, Department of Agronomy and Plant Breeding, Zanjan University, Zanjan, Iran

Behnam.Derakhshani@yahoo.com

Abstract

Oxford Nanopore system, as the third-generation DNA sequencing technology, are being developed for fast and direct sequencing of single DNA molecules by detection of ionic current modulations as DNA passes through a pore. Moreover, the single molecule techniques used by this technology allow us to identify proteins, MicroRNAs as well as their concentrations. Oxford Nanopore systems open a new door to molecular biology investigation at the single-molecular level. Due to the blockades of ionic current, nanopores can help us to get information about the identity, concentration, structure and dynamics of target proteins and miRNAs. The Oxford Nanopore has introduced a new device namely MinION, with the size of a USB memory stick, which can sequence the entire human genome for less than $1000. High speed, sensitivity in detection of single nucleotides and the ability of reading long sequences of DNA molecules have made the nanopores as promising technology in high throughput sequencing. Since the lack of proper Persian language resources, the authors intend to introduce this technique for researchers.

Keywords: Oxford Nanopore, Third generation sequencing, MinION, miRNA.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-07-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1395.9.1.3.5]