1. چون فرم CDNA نسبت به فرم RNA پایداری بیشتری دارد و از انجایی که می توان از CDNA برای مطالعه RNA در بسیاری از تکنیک های DNA محوری مثل PCR و sequencing استفاده نمود، این موضوع اهمیت این تبدیل را بیش از پیش نشان می دهد. اگر این تبدیل صورت نگیرد مشکلاتی را به همراه خواهد داشت که از مهمترین آنها به موارد زیر می توان اشاره کرد:
2. تجزیه: RNA مستعد تجزیه توسط RNAase ها می باشد که منجر به از دست رفتن مواد ژنتیکی و ارائه نادقیق رونوشتگان می شود.
3. بدون تبدیل به CDNA، مواد ژنتیکی کافی برای توالی یابی وجود نخواهد داشت و از آنجایی که مولکول های RNA به مقادیر کم در مقایسه با DNA در سلول وجود دارند، عملیات توالی یابی عملا غیر ممکن می شود.
4. ناتوانی در دریافت mRNA: mRNA که نشان دهنده توالی رونیسی ژنهاست در RNA Sequencing بسیار مورد توجه بوده و عدم رونویسی معکوس آن به cDNA کار هدف گیری توالی یابی mRNA را به شدت سخت می نماید.
5. فرایند آماده سازی کتابخانه توالی یابی برای اطمینان از دقت RNA seq ها اهمیت دارد. این مرحله شامل فرایند های مهمی برای کمینه کردن خطا می باشد:
6. انتخاب اندازه و RNA fragmentation: مولکول های RNA به قطعات کوچکتری تکه می شوند تا فرایند توالی یابی آسانتر شود. کنترل کردن اندازه قطعات طی فرایند انتخاب سایز، اطمینان حاصل می کند که کتابخانه توالی یابی دارای قطعاتی با اندازه مناسب برای توالی یابی دقیق و نگاشت به ژنوم مرجع می باشد.
7. رونویسی معکوس و سنتز cDNA: با رونویسی معکوس RNA به cDNA تبدیل می شود. سنتز کارامد و یکنواخت cDNA برای دریافت دقیق transcriptome ضروری است. خطا در این مرحله می تواند منجر به ارائه ناقض گونه های RNA و تعیین نادقیق سطوح بیان ژن می شود.
8. اتصال آداپتور: آداپتور هایی که شامل توالی ضروری برای توالی یابی و تقویت کتابخانه هستند، به پایانه های انتهای cDNA متصل می شوند. اتصال آداپتور مناسب موجب توالی یابی کارامد کتابخانه می شود. و در صورت انجام نشدن درست این مرحله منجر به از دست رفتن خوانش های توالی یابی می شود.
9. تقویت PCR: تقویت PCR برای تولید تعداد کافی نسخه از کتابخانه توالی یابی برای انجام عمل توالی یابی است. بهینه سازی دقیق شرایط PCR برای کمینه کردن بایاس ها و ارائه یکنواخت گونه های RNA در کتابخانه می شود.
10. نرمال سازی و تعیین مقدار کتابخانه: تعیین مقدار و نرمال سازی دقیق کتابخانه توالی یابی این امکان را میدهد تا مقادیر برابری از DNA به ابزار توالی یابی بارگذاری شوند. این مرحله برای کمینه کردن بایاس های توالی یابی و اطمینان از شانس مساوی هر مولکول RNA برای توالی یابی به کار می رود.
11. توانایی RNA-seq در شناسایی رونوشت های جدید، به درک ما از عملکرد ژن با آشکار سازی مولکول های RNA ناشناخته کمک عظیمی می نماید. به عنوان مثالی از این کاربرد می توان به کشف ژن های fusion در سرطان اشاره کرد . ژن های fusion از بازآرایی کروموزمی حاصل می شوند و مرتبط با سرطان هستند. شناسایی رونوشت های fusion جدید، می تواند اطلاعات تشخیصی و پیش بینی کننده ارزشمندی را در اختیار پژوهشگران قرار دهد. مورد دیگری که می توان به آن اشاره ای داشت، کشف non coding RNA ها می باشد. RNA Seq می تواند مولکول های RNA غیر کدشونده مثل مولکول های RNA غیرکدشونده بلند(lncRNA) و miRNA را که نقش های متنوعی را در تنظیم ژن، بازمدل سازی کروماتین و سایر فرایند های سلولی بر عهده دارند را شناسایی نماید. فهم کاربرد این ncRNA ها می تواند بینش عمیقی را در باب عملکرد شبکه های تنظیم ژن به ارمغان بیاورد.
12. محقیقن ممکن است به دلایل زیر RNA seq را به microarray ها برای مطالعات بیان ژن ترجیح دهند:

**مزیت های RNA-seq:**

1. حساسیت بالا و برد وسیع: RNA seq می تواند سطوح گسترده تری از بیان ژنها را در رونوشت های مختلف شناسایی نماید.
2. شناسایی رونوشت های جدید: بر خلاف ریز آرایه ها، RNA seq ها می توانند رویداد های پیرایش دگرسان، RNA های غیر کدشونده و رونوشت های تازه را شناسایی نمایند که این موضوع دید جامع تری از رونوشتگان فراهم می آورد.
3. مقیاس تک مبنا: RNA seq، مقیاس در سطح نوکلئوتید را فراهم می آورد که به نگاشت دقیق محل های آغاز رونویسی، نواحی برش و گونه های توالی یابی کمک می نماید. این اتفاق با ریز آرایه ها که از توالی جستجو از پیش تعیین شده بهره می برند میسر نیست.
4. نویز پس زمینه کاهش یافته و هم تیرگی متقاطع(cross hybridization): ریز آرایه ها به دلیل نویز زمینه و هم تیرگی متقاطع، اندازه گیری های نادقیقی را در بیان ژن ها ارائه می دهند.
5. انعطاف پذیری در آنالیز downstream : داده RNA seq می تواند برای آنالیز های downstream مختلفی مثل آنالیز بیان ژن، تعیین مقدار ایزوفرم و شناسایی گونه های ژنتیکی و ... مورد استفاده قرار گیرد.

**مزیت های microarray:**

1. هزینه کمتر: ریز آرایه ها هزینه های کمتری را به خصوص در مطالعات با مقیاس کوچک به نسبت RNA seq ها شامل می شوند.
2. فناوری تثبیت شده: سالیان سال است که ریز آرایه ها به میزان گسترده ای برای مطالعات بیان ژنی و پروتکل ها مورد استفاده قرار گرفته و دارای خط لوله ها و پروتکل های تجزیه و تحلیل تثبیت شده ای می باشند.
3. گذردهی بالا: ریز آرایه ها می توانند، صدها هزار ژن را به طور همزمان در یک آزمایش مورد بررسی قرار دهند که آنها را برای مطالعات رخ نما نگاری بیان ژن با مقیاس بزرگ مناسب می نماید.
4. پیچیدگی محاسباتی کمتر: آنالیز داده ریز آرایه، معمولا به منابع محاسباتی کمتری در مقایسه با RNA seq نیاز دارد.

**معایب RNA seq:**

1. هزینه بالاتر: RNA seq ها معمولا هزینه های بالاتری را علی الخصوص در مطالعات با مقیاس بزرگ شامل میشود.
2. پیچیدگی محاسباتی بالا
3. بایاس های بالقوه و تغییر پذیری: آنالیز داده RNA seq می تواند به وسیله ی بایاس ها در هنگام آنالیز داده و توالی یابی به شدت تحت تاثیر قرار گرفته و دقت اندازه گیری های بیان ژن را دستخوش تغییر نماید.

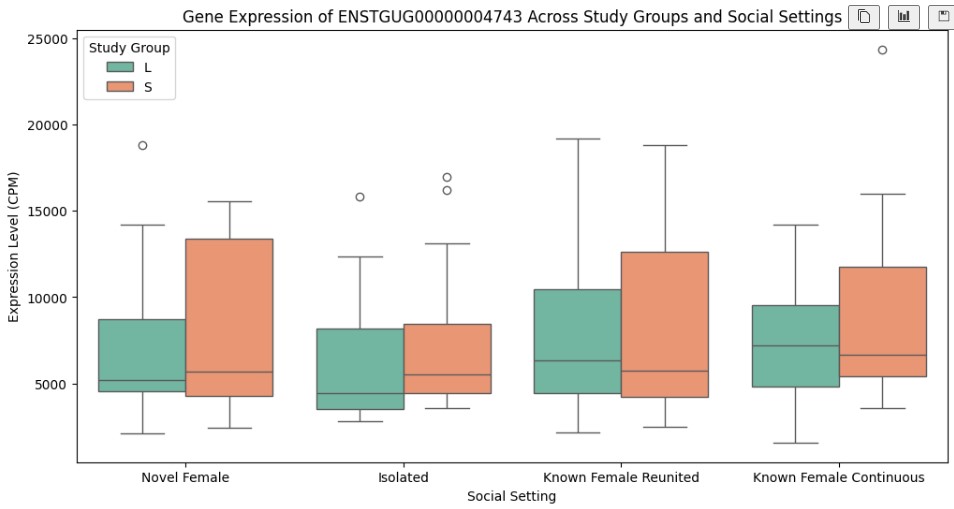
**معایب ریز آرایه ها:**

1. برد پویا و میزان حساسیت محدود: این اتفاق می تواند موجب کاهش دقت اندازه گیری رونوشت های با فراوانی کم شود.
2. انعطاف پذیری پایین در شناسایی رونوشت های جدید: ریزآرایه ها به توالی های جستجو از پیش تعیین شده ای متکی هستند که این امر توانایی آنها را در شناسایی رونوشت های جدید و non coding RNA ها محدود می کند.

بخش دوم

1. تنوع در تعداد خوانش ها در بین ژنهای مختلف به فاکتور های بیولوژیکی زیادی بستگی دارد :
2. سطح بیان ژن: ژنهای با سطوح بیان بالاتر معمولا خوانش های توالی یابی بیشتری دارند در مقایسه با ژنهایی که سطوح بیان پایین تری دارند.
3. طول ژن: ژنهای با طول بیشتر، خوانش های توالی یابی بیشتری به علت اندازه بزرگتر دارند.
4. فراوانی رونوشت و تنوع ایزوفرم: ژن ها می توانند چندین ایزوفرم mRNA از طریق alternative splicing تولید نمایند. این ایزوفرم ها می توانند سطوح بیان متفاوتی داشته و این موضوع می تواند به تنوع در تعداد خوانش ها میان رونوشت های مختلف یک ژن شود.
5. تنظیم رونوشتی: تفاوت در مکانیسم های تنظیمی که بیان ژن را تنظیم می نمایند، می تواند منجر به تنوع در تعداد خوانش ها بین ژنها شود.
6. پایداری RNA و واژگون شدگی: پایداری مولکول های mRNA می تواند بین ژنهای مختلف متفاوت باشد که این موضوع بر فراوانی و تعداد خوانش های بعدی تاثیر می گذارد. ژنهایی با رونوشت پایدار تر ممکن است تعداد خوانش های بیشتری داشته باشند.
7. تنوع بیولوژیکی: فاکتور های بیولوژیکی مثل نوع سلول، مرحله توسعه، تخصص یافتگی بافت و شرایط محیطی می تواند بر سطوح بیان ژن تاثیر گذاشته و باعث تنوع در تعداد خوانش ها شود.
8. تنوع تجربی: تنوعی که در هنگام آماده سازی نمونه ها، ساخت کتابخانه، توالی یابی و تحلیل داده ایجاد می شود می تواند منجر به تفاوت هایی در تعداد خوانش های ژن های مختلف شود. فاکتور هایی از جمله تجزیه RNA، عمق توالی یابی و روش های نرمال سازی می تواند دقت و بازتولید اعداد خوانش ها را تحت تاثیر قرار دهد.
9. از دلایلی که به تنوع تعداد خوانش ها در یک ژن می انجامد می توان به موارد زیر اشاره کرد:
10. تنوع بیولوژیکی: سیستم های بیولوژیکی تنوع ذاتی را به علت فاکتور هایی از جمله پیش زمینه ژنتیکی، ترکیب نوع سلول و شرایط فیزیولوژیکی نشان می دهند. تفاوت در سطوح بیان ژن بین این نمونه ها می تواند از تنوع در این فاکتورهای بیولوژیکی حاصل شود.
11. شرایط تجربی: تنوع در شرایط تجربی و آزمایشگاهی مثل کار با نمونه، استخراج نمونه، آماده سازی کتابخانه و پروتکل های توالی یابی می تواند دقت و بازتولید اندازه گیری های بیان ژن را تحت تاثیر قرار دهد. ناسازگاری ها در روند های آزمایشی در میان نمونه ها می تواند منجر به تنوع در تعداد خوانش ها شود.
12. ناهمگونی نمونه: نمونه های بیولوژیکی ممکن است شامل جمعیت های ناهمگون با خصوصیات بیان ژن متفاوت شود. تنوع در ترکیب سلول میان نمونه های می تواند تعداد خوانش ها را برای یک ژن تحت تاثیر قرار دهد.
13. روش های نرمال سازی: روش های نرمال سازی متفاوتی برای جبران بایاس های سیستماتیک و تنوع در عمق توالی یابی میان نمونه ها به کار گرفته می شود. نوع روش نرمال سازی به کارگرفته شده بر تعداد نسبی خوانش ها میان نمونه ها تاثیر گذار خواهد بود.
14. پاسخ های بیولوژیکی به انحرافات: پژوهش هایی که بیان ژن را میان شرایط مختلف آزمایشگاهی مقایسه می کند ممکن است تنوعاتی را در تعداد خوانش ها برای یک ژن به علت پاسخ بیولوژیکی به انحرافات مشاهده نمایند.
15. فن ساخت های فنی: فاکتور های فنی مثل خطاهای توالی یابی، بایاس های تقویت PCR و تنوع پذیری عمق توالی یابی می تواند باعث ایجاد نویز در داده بیان ژن شود که نهایتا تنوع در تعداد خوانش ها میان نمونه ها را به ارمغان می آورد.
16. اگر یک ژن تعداد خوانش بالایی را در یک نمونه و تعداد خوانش پایینی را در نمونه دیگر نشان می دهد، این موضوع نشان دهنده بیان متفاوت آن ژن بین دو شرایط است. حال در مورد پاسخ Zebra Finch به محیط اجتماعی و چالش LPS چنین بیان متفاوت ژن این موضوع می تواند بینش ارزشمندی از نقش بالقوه پاسخ پرنده به تعاملات اجتماعی و چالش ایمنی فراهم آورد:
17. تعداد خوانش بالا در یک نمونه: تعداد خوانش بالا یک نمونه برای یک ژن نشان می دهد که آن ژن به شکل عظیمی در آن شرایط خاص بیان می شود. در مورد Zebra Finch، یک ژن با تعداد خوانش بالا احتمالا در فرایند های مرتبط با پاسخ استرس، تنظیم رفتار اجتماعی و انعطاف پذیری عصبی مرتبط است.
18. تعداد خوانش کم در نمونه ای دیگر: تعداد خوانش کم برای یک ژن در نمونه ی دیگر نشان می دهد که ممکن است نقش واسطه ای در پاسخ پرنده به شرایط اجتماعی یا چالش LPS داشته باشد. در مورد چالش LPS، ژنی با تعداد خوانش کم در یک نمونه ممکن است پاسخی را در برابر یک شرایط تحریک آمیز برانگیخته نکند که احتمالا بیانگر نقش بالقوه در مسیر های پاسخ ایمنی یا تعدیل تحریک است.
19. مفاهیم عملکردی: تفاوت بیان ژن بین دو شرایط نشان می دهد که ممکن است نقشی در تسهیل پاسخ پرنده به محیط اجتماعی اش یا چالش LPS داشته باشد. توصیف عملکردی یک ژن، مثل آنالیز هستی شناسی ژن، تحلیل مسیر یا آزمایشات صحه سنجی می تواند درک عمیقی را از عملکرد های بیولوژیکی و مکانیسم های مولکولی آن ژن فراهم آورد.
20. تجمیع با داده های دیگر: تجمیع داده بیان ژن با داده های پروتئومیک یا متابولومیک و اندازه گیری های فیزیولوژیکی و رفتاری می تواند نقش ژن را پاسخ Zebra Finch به تعاملات اجتماعی و چالش ایمنی نشان دهد.این رویکرد تلفیقی می تواند بینش جامعی از مسیر های مولکولی و فرایند های بیولوژیکی موجود در پاسخ های پرنده به محرک های اجتماعی به ارمغان آورد.

بخش چهارم



Brain derived neurotrophic factor پروتئینی است که به وسیله ژن BDNF در انسان ها بیان می شود. به خانواده نوروتروفین ها تعلق دارد و نقش مهمی را در رشد، بقا و تمایز نورونها در سیستم عصبی مرکزی ایفا می نمیاد. BDNF در بسیاری از فرایند های فیزیولوژیکی از جمله انعطاف پذیری سیناپسی، یادگیری، حافظه و تنظیم خلق و خو دخیل است. تحقیقات نشان داده ناتنظیمی بیان BDNF، در بسیاری از اختلالات روانی و عصبی مثل افسردگی، آلزایمر و شیزوفرنی دخیل بوده است.

تصویر فوق نشان می دهد، سطوح بیان ژن در شرایط ملاقات با جنس مونث جدید در گروه S به میزان قابل توجهی از گروه LPS بالاتر است. در شرایط ایزوله شده هر دوگروه در کمترین مقدار خود به نسبت وضعیت های اجتماعی دیگر قرار دارند. این نشان می دهد در شرایط ایزولگی و تنهایی تغییری در بیان ژنها به نسبت دیگر تعاملات اجتماعی ایجاد نمی کند. در شرایط اجتماعی know female reunited وضعیت مشابه حالت novel female است با این تفاوت که میزان بیان ژن کمی در گروه L بالاتر است. در وضعیت known female continuous هم شرایط به همین صورت است با این تفاوت که سطوح بیان ژن در هر دو حالت کمی به نسبت قبل پایین تر است.