

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Preddiplomski studij kemije

Rene Trupković

## **Nove metode sekvenciranja DNA**

Završni rad

Mentor: doc. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik

Neposredni voditelj: dr. sc. Ana Amić

Osijek, 2018.

## SAŽETAK

Sekvenciranje DNA je metoda koja omogućava određivanje redoslijeda nukleotida u DNA molekuli. Metode se dijele na tri generacije, koje se razlikuju po brzini, preciznosti, propusnosti, veličini fragmenata, te načinu njihove detekcije i analize. 1977. godine razvijena je Sangerova metoda, temeljena na sekvenciranju DNA fragmenata pomoću prethodno obilježenih dideoksinukleotid trifosfata koji sprječavaju povezivanje daljnjih nukleotida i time prekidaju sintezu lanca DNA. Paralelno sa Sangerovim otkrićem, 1977. godine Maxam i Gilbert razvijaju metodu temeljenu na nasumičnom cijepanju fragmenata DNA na različitim bazama s obzirom na korišteni agens (hidrazin, dimetil sulfid i dr.). Razvojem tehnologije dolazi do pojave metoda druge generacije kao što je pirosekvenciranje u kojem prilikom polimerizacije DNA dolazi do otpuštanja pirofosfata i emitiranja fotona koji služe za detekciju fragmenata. Pojavom detekcije u stvarnom vremenu otvorene su nove mogućnosti sekvenciranja DNA, poput monomolekulskog sekvenciranja (SMRT), te sekvenciranje pomoću nanopora. Sukladno razvoju novih metoda, otkrivene su nove tehnike sekvenciranja poput 454 pirosekvenciranja, Illumina, SOLiD, te HeliScopea. Korištenje metoda sekvenciranja DNA omogućava napredak brojnih prirodnih znanosti, poput genetike, biomedicine i biokemije, ali i napredak u proučavanju raznih bolesti, kao i u razvoju novih lijekova.

**Ključne riječi:** sekvenciranje DNA, pirosekvenciranje, SMRT sekvenciranje, sekvenciranje nanoporama

## ABSTRACT

DNA sequencing is a method that allows determination of nucleotide order in DNA molecule. Methods are divided into three generations, which differ in speed, precision, throughput, fragment size, and detection and analysis. In 1977, Sanger *et al.* developed a method based on DNA sequencing by pre-labelled dideoxynucleotide triphosphates, which prevent incorporation of further nucleotides and interrupt synthesis of DNA chain. In 1977, Maxam and Gilbert developed another method based on random cleavage of fragments depending on the used agents (hydrazine, dimethyl sulfide, etc.). Advancement of technology led to the development of the second generation methods, such as pyrosequencing in which DNA polymerization results in the release of pyrophosphates and emission of photons, used for the detection of fragments. Real-time detection opens new possibilities for DNA sequencing, such as single molecule real time sequencing (SMRT) and nanopore sequencing. In accordance with the development of new methods, new sequencing techniques, such as 454 pyrosequencing, Illumina, SOLiD and HeliScope, are discovered. The use of DNA sequencing allows advancement of numerous natural sciences, such as genetics, biomedicine and biochemistry, as well as a progress in studying of various diseases and development of novel drugs.

**Keywords:** DNA sequencing, pyrosequencing, SMRT sequencing, nanopore sequencing

## Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Literaturni pregled.....	2
2.1. Sangerova metoda.....	2
2.1.1. Analiza fragmenata DNA.....	5
2.2. Maxam i Gilbert metoda.....	6
2.3. Pirosekvenciranje.....	7
2.4. Monomolekularno sekvenciranje u stvarnom vremenu.....	9
2.5. Sekvenciranje pomoću nanopora.....	11
2.6. Tehnike novih metoda sekvenciranja DNA.....	12
2.6.1. 454 GenomeSequencer.....	12
2.6.2. Illumina Genome Analyzer .....	13
2.6.3. Sekvenciranje ligacijom i detekcijom oligonukleotida .....	15
2.6.4. HeliScope .....	16
3. Zaključak.....	17

## 1. Uvod

Molekula DNA otkrivena je 1869. godine, no opsežna istraživanja prirode ove molekule počinju tek sredinom 20. stoljeća. Točnije, 1944. godine kada su MacLeod, Avery i McCarty eksperimentalno dokazali da molekula DNA ima mogućnost promjene karakteristika i svojstava pojedinih stanica. Velika prekretnica u istraživanju DNA dogodila se 1953. godine, kada Watson i Crick predlažu model dvostruke uzvojnice (poznatije kao dvostruki heliks) koja je komplementarno povezana vodikovim vezama između 4 dušične baze – adenina (A), gvanina (G), citozina (C) i timina (T). Daljnjim istraživanjima, početkom 1970-ih godina razvija se znanstvena metoda nazvana sekvenciranje DNA pomoću koje je moguće odrediti redoslijed nukleotida u DNA molekuli [1].

Do danas su razvijene brojne metode sekvenciranja DNA koje se razlikuju po svojstvima kao što su brzina, preciznost, propusnost, duljina očitavanja sekvenci DNA, cijena, te priprema samih uzoraka za analizu. Podijeljene su u tri generacije; prvu generaciju čine Sangerova metoda i Maxam-Gilbertova metoda, u drugu generaciju ubrajaju se metode poput pirosekvenciranja i metode ligacijskog sekvenciranja, dok treću generaciju čine monomolekularno sekvenciranje u stvarnom vremenu i sekvenciranje pomoću nanopora. Korištenje i usavršavanje ovih metoda doprinosi razvoju mnogih prirodnih znanosti poput genetike, molekularne biologije, forenzike i mnogih drugih. Stoga ne čudi da je sekvenciranje DNA izuzetno važan alat koji pomaže pri realizaciji novih otkrića i pri daljnjem razvoju pojedinih znanstvenih grana. Međutim, razvoj ovih metoda doveo je do pojave brojnih problema, poput bioetičkih pitanja, javne sigurnosti i zdravlja [2]. U nastavku rada opisane su pojedine metode sekvenciranja, analizirane su njihove prednosti i nedostaci, te je dan pregled novijih tehnika sekvenciranja razvijenih u posljednja dva desetljeća.

## 2. Literaturni pregled

Metode sekvenciranja DNA dijele se u tri generacije. Prvu generaciju čine Sangerova i Maxam-Gilbert metoda, koje za detekciju koriste elektroforezu na poliakrilamidnom gelu. Razvojem tehnologije dolazi do otkrivanja visokopropusnih metoda (engl. *high throughput*), koje čine pirosekvenciranje (454), sekvenciranje sintezom (Illumina), te ligacijsko sekvenciranje koje čine drugu generaciju metoda sekvenciranja DNA. Dalji razvoj znanosti i tehnologije omogućuje sekvenciranje u stvarnom vremenu (engl. *Real Time Sequencing*) te se pojavljuje nova, treća generacija metoda sekvenciranja DNA, koja uključuje monomolekularno sekvenciranje u stvarnom vremenu (engl. *Single Molecule Real Time Sequencing*, SMRT) i sekvenciranje pomoću nanopora.

### 2.1. Sangerova metoda

Prva metoda sekvenciranja DNA, poznatija je kao „plus-minus“ metoda koju su razvili Sanger i sur. 1975. godine, koristila je DNA polimerazu *Escherichie coli* i bakteriofaga T4 [3]. Produkti sinteze DNA potom se odvajaju ionoforezom<sup>1</sup> na akrilamidnom gelu. „Plus-minus“ metoda se pokazala neučinkovitom, te je dvije godine kasnije zamijenjena enzimskom polimerizacijom poznatijom kao lančano-terminacijska ili dideoksinukleotid metoda. Temelji se na korištenju dideoksinukleotid trifosfata (ddNTP) dodanih mononukleotidima koji se inače nalaze u DNA [4]. Razlika između spomenutih nukleotida je u vodikovom atomu koji se nalazi na 3' ugljikovom atomu umjesto hidoksilne skupine (–OH). Takvi nukleotidi sprečavaju dodavanje i povezivanje dodatnih nukleotida, čime se prekida daljnja sinteza lanca DNA. Prije samog sekvenciranja, dvolančana molekula DNA razdvojena je na dvije jednolančane niti. Potom se primer<sup>2</sup>, koji je prethodno fluorescentno ili radioaktivno označen [5], poveže na lanac DNA koja služi kao predložak za sintezu komplementarnog lanca. Primer je 3'-krajem pozicioniran na specifično mjesto koje služi kao početna točka sinteze DNA. Uzorak se potom podijeli u četiri tube označene kao „A“, „G“, „C“, i „T“ u koje su dodani DNA polimeraza i komplementarni dideoksinukleotid trifosfati (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP), te dolazi do sinteze DNA sve do vezanja dideoksinukleotid trifosfata koji prekida daljnju sintezu DNA. U svakoj od tuba

---

<sup>1</sup> Gibanje nabijenih čestica u koloidu pod utjecajem električnog polja

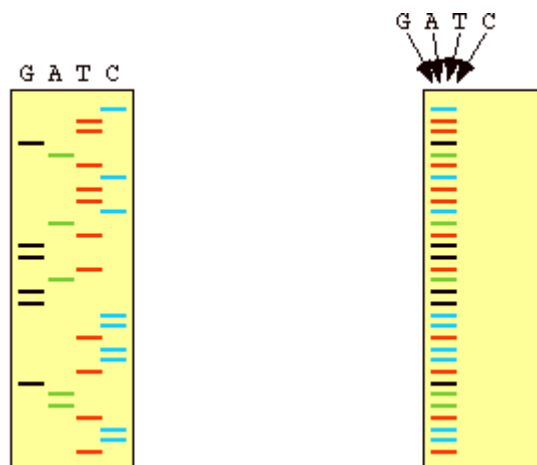
<sup>2</sup> Manji dio jednolančane molekule DNA koji služi kao startna točka sinteze DNA

reakcija započinje od istog nukleotida, a završava sa specifičnom bazom, koja je definirana vrstom dideoksinukleotid fosfata dodanog u pojedinu tubu (slika 1.). Nastali fragmenti su različite dužine, ali svi završavaju istim dideoksinukleotid trifosfatom.



Slika 1. Primjer fragmenata DNA koji mogu nastati u „G“ tubi [6, 7].

Nakon vezanja dideoksinukleotid trifosfata i prekida sinteze DNA, prije elektroforeze dvolančana molekula DNA ponovno se razdvaja na zasebne lance, dok se DNA fragmenti iz tuba prenose na poliakrilamidni gel u četiri paralelne linije, kako bi se odvojili lanci različitih dužina. Gel je potom izložen UV ili X-zrakama, ovisno o tome kako je primer na početku procesa bio označen. Dobivenu sekvencu DNA moguće je iščitati iz autoradiograma poliakrilamidnog gela. Kasnije je metoda automatizirana kako bi se veće količine DNA mogle sekvencirati u kraćem vremenskom periodu. Umjesto četiri različite tube koristi se jedna koja sadrži sve četiri vrste ddNTP-a, pri čemu je svaki označen drugom bojom. Zbog čega je moguće koristiti i samo jednu liniju na poliakrilamidnom gelu. Korištenjem različitih boja omogućava se lakše određivanje vrpci, obzirom na valnu duljinu na kojoj boja fluorescira [2]. Rezultati se prikazuju u obliku kromatograma, gdje svaka boja određuje drugu bazu (slika 2.).



Slika 2. Primjer poliakrilamidnog gela s četiri tube (lijevo) i jednom tubom (desno) s četiri ddNTP-a [6, 7].

Veliki utjecaj na kvalitetu DNA sekvenci i samog sekvenciranja imali su korišteni enzimi. Kod prvih istraživanja koristili su se enzimi koji su bili izrazito osjetljivi na temperaturu i vrijeme samog eksperimenta, te je dolazilo do njihove deaktivacije, što predstavlja značajan problem [8, 9]. Rješenje se nalazilo u otkriću i korištenju lančane reakcije polimeraze (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) te Taq polimeraze<sup>3</sup> koja je termostabilna, što je rezultiralo smanjenjem potrebnih DNA predložaka [10]. 1980-ih godina javljaju se eksperimenti koji koriste amplifikaciju te pročišćavanje predložaka za sekvenciranje [11]. Posljedica amplifikacije bila je proizvodnja kultura zaraženih fagom, dok se pročišćavanjem dobiva čist jednolančani predložak [12].

Za označavanje pojedinih sekvenci DNA, kao i primera, korišteni su različiti materijali. Korištenjem radioizotopa povećala se oštrina promatranih niti, kao i rezolucija autoradiograma. Također, detekcija pomoću kemiluminescencije korištena je kao alternativa. 5'-kraj oligonukleotida, vezan za biotin, korišten je kao primer, dok je enzim fosfataza, vezan za 5'-kraj streptavidinom, katalizirao reakciju luminescencije. Emitirani fotoni su potom bili detektirani na fotografskom filmu [13].

<sup>3</sup> DNA polimeraza izolirana iz termofilne bakterije *Thermus aquaticus*



### 2.1.1. Analiza fragmenata DNA

Fragmenti DNA dobiveni Sangerovom metodom razdvajaju se elektroforezom na poliakrilamidnom gelu. Najveći problemi u ovoj fazi sekvenciranja vezani su uz sam gel, a odnose se na pripremu gela, nanošenje uzoraka na gel, te očuvanje gela nakon elektroforeze. Razvojem tehnologije omogućeni su bolji rezultati, zahvaljujući korištenju tanjeg sloja gela [14], stabiliziranju temperature tijekom elektroforeze [14], te zahvaljujući promjeni gradijenta gela [15]. Najveći pomak napravljen je korištenjem kapilarne gel elektroforeze (engl. *Capillary Gel Electrophoresis*, CGE), koja je omogućila analizu biopolimera na velikoj površini uz upotrebu jačeg električnog polja, što je rezultiralo bržim razdvajanjem fragmenata [16]. Prednost kapilarne gel elektroforeze je i njezina visoka selektivnost. Međutim, problemi poput kratkog života kapilara, te problemi kod ubrizgavanja otopina upućivali su na malu propusnost [17]. Korištenje linearnih polimernih otopina omogućilo je ponovnu uporabu istih kapilara, čime je dio problema uspješno otklonjen. Nadalje, omogućeno je odvijanje paralelne kapilarne elektroforeze (engl. *Capillary Array Electrophoresis*, CAE) [18, 19]. Korištenjem CAE-a omogućen je završetak Projekta ljudskog genoma (engl. *Human Genome Project*, HGP), odnosno sekvenciranja čitavog ljudskog genoma [20].

Kao alternativna tehnika sekvenciranja koristila se masena spektrometrija. Najčešće upotrebljavana tehnika bila je laserska desorpcija/ionizacija potpomognuta matricom-vrijeme leta (engl. *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight*, MALDI-TOF) [21]. MALDI-TOF koristi spojeve koji apsorbiraju energiju određene valne duljine. Uzorak se pogodi laserskim pulsom odgovarajuće valne duljine, nakon čega oslobođeni ioni uzorka putuju kroz tubu gdje se odvajaju s obzirom na masu i naboj. Najveći nedostatak ove metode je smanjena osjetljivost i učinkovitost pri analizi uzoraka velike molekularne mase [22].

## 2.2. Maxam i Gilbert metoda

Godine 1977. Maxam i Gilbert su razvili novu metodu sekvenciranja DNA koja se bazira na nasumičnom kemijskom cijepanju DNA fragmenta, ovisno o korištenom kemijskom agensu (difenilamin, hidrazin, dimetil sulfid i dr.). Razdvajanje fragmenata odvija se u tri koraka: modificiranje baze, odvajanje modificirane baze od šećernog dijela, te odvajanje DNA niti na poziciji šećernog dijela prethodno odvojene modificirane baze. Potom slijedi odvajanje produkata elektroforezom na poliakrilamidnom gelu [23].

Fragmenti DNA su odvojeni određenim restrikcijskim enzimima. Dobiveni predlošci koji su označeni fosfatom  $^{32}\text{P}$  kasnije su zamijenjeni M13 primerom<sup>4</sup>, stabilnijim u daljnjim kemijskim reakcijama, zbog čvršćeg vezanja fluoresceina za oligonukleotide [24]. Također, korištena je i već spomenuta detekcija pomoću kemiluminescencije [25]. Međutim, prve metode bile su ograničene budući da je izvedba metode bila manualna [26]. Kasnije, uvođenjem kompjuterski kontroliranih mikrokemijskih robota, koji provodi jednu od četiri reakcije (G, A+C, C+T ili C), proces je značajno ubrzan [27].

Kako bi se uklonili problemi poput gubitka DNA i kompleksnosti koraka kemijskih reakcija, predložena je metoda koja imobilizira DNA adsorpcijom na dietilaminoetil (engl. *diethylaminoethyl*, DEAE) papir. Kasnije je nazvana pojednostavljena kruto-fazna tehnika za sekvenciranje (engl. *Solid State DNA Sequencing*) koja se pokazala bržom i učinkovitijom [28]. Zbog nedostataka metode kao što je povećana mehanička lomljivost, koristi se anion-zamjenski papir za kemijsko sekvenciranje (engl. *Chemical Sequencing Anion-Exchange Paper*), koji je otklonio navedeni problem [29]. Ova pojednostavljena kruto-fazna metoda DNA sekvenciranja također je uklonila i potrebu za replicirajućim i pročišćavajućim koracima [30]. Kruto-fazna metoda primjenjiva je samo na manjim DNA fragmentima, zbog čega je uvedena nova metoda bazirana na faznoj kromatografiji koja omogućuje sekvenciranje i analizu dužih fragmenata DNA [31].

Ono što Maxam-Gilbert metodu razlikuje od Sangerove metode su kemijske reakcije. Na temelju reakcija, metodu možemo podijeliti u dvije glavne skupine, četvero-linijsku i jedno-linijsku metodu. Četvero-linijska metoda koristi četiri originalne kemijske reakcije odvajanja fragmenta (G, A+G, C, C+T), te se analizira na četiri paralelne linije gela, dok jedno-linijska metoda koristi jednu liniju gela [32]. Upravo zbog spomenutih reakcija razdvajanja, Maxam-Gilbert metoda sekvenciranja pruža neke prednosti u usporedbi sa

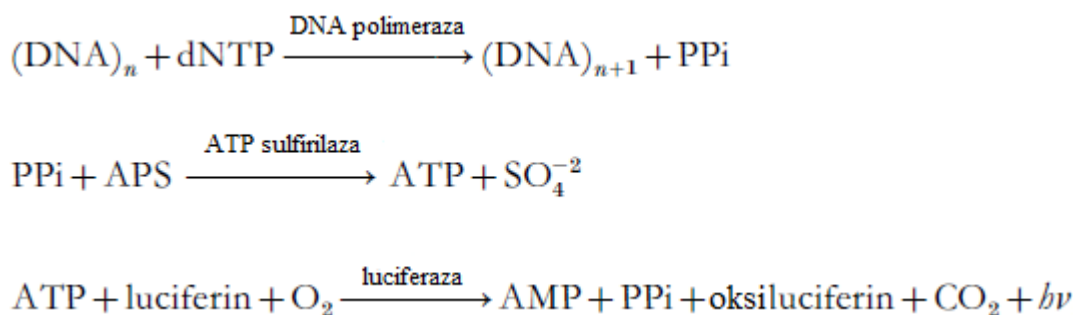
---

<sup>4</sup> Jednolančani primer koji sadrži oligonukleotide označene fluoresceinom

Sangerovom metodom, kao što su mogućnost sekvenciranja na originalnom DNA fragmentu bez potrebe za PCR reakcijama, smanjena učestalost pogrešaka, jednostavnost izvedbe, bolje kontrolirani uvjeti izvedbe, te točnije očitavanje rezultata [33]. Metoda se koristi u različite svrhe, primjerice za sekvenciranje genoma [34], lociranje rijetkih baza [35], detektiranje mutacija [36], analiziranje interakcija između DNA i proteina [37], i sl.

### 2.3. Pirosekvenciranje

Pirosekvenciranje (engl. *pyrosequencing*) je metoda druge generacije sekvenciranja DNA koja se temelji na detekciji otpuštenog pirofosfata (PPi) u reakcijama DNA polimerizacije [38, 40]. Podijeljena je u tri različita koraka (slika 3). Prvi korak je polimerizacija, gdje se određeni deoksinukleotid (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) veže na postojeći DNA lanac pomoću DNA polimeraze. Oslobađa se pirofosfat koji se nakon toga reagira u drugom koraku s adenzin-5'-fosfosulfatom (APS), te uz pomoć ATP sulfurilaze tvori adenzintrifosfat (ATP). U zadnjem koraku, emitirana svjetlost luciferaze katalizira pretvorbu luciferina u oksiluciferin [39].



Slika 2. Glavni koraci pirosekvenciranja [2].

Energija se oslobađa u obliku svjetla ( $h\nu$ ), a broj emitiranih fotona u svakom predlošku jednak je broju nastalih pirofosfata, odnosno broju deoksinukleotida koji su pridodani DNA lancu. Jačina emitiranog svjetla daje podatak je li došlo do dodavanja dNTP-a na lanac i koliko dodavanja se dogodilo u ukupnoj reakciji [39].

Napretkom tehnologije dolazi do razvoja više podmetoda pirosekvenciranja baziranih na enzimima koji se koriste u spomenutim reakcijama, a glavna podjela je na kruto-fazno i tekućinsko-fazno pirosekvenciranje. Kruto-fazno sekvenciranje ima dodatni

korak u kojem je predložak potrebno isprati kako bi se uklonili nepovezani i nepoželjni deoksinukleotidi, kao i ATP iz drugog koraka [40]. Tekućinsko-fazno sekvenciranje se sastoji od smjese četiri enzima, tri prethodno navedena i četvrti dodatni enzim koji služi za čišćenje neizreagiranih deoksinukleotida. Kasnije je metoda doradena tako da koristi proteine koji vežu jednolančanu DNA, odnosno povezuju primer s DNA predloškom, što se pokazalo uspješnim zbog veće učinkovitosti enzima, većeg intenziteta signala i veće mogućnosti čitanja nukleotida [41].

Pirosekvenciranje ima neke prednosti u odnosu na Sangerovu i Maxam-Gilbertovu metodu sekvenciranja, kao što su izostanak koraka poput označavanja primera, označavanja nukleotida i gel elektroforeze. *Real-time* detekcija<sup>5</sup> omogućava bržu obradu rezultata, sve se reakcije odvijaju na sobnoj temperaturi i pri fiziološkom pH, a i troškovi metode su niži od troškova ranije spomenutih metoda [42]. S druge strane, metoda ima i neke nedostatke, poput gubitka signala prilikom ispiranja predložaka, smanjenja enzimske moći, teškoća pri određivanju broja nukleotida zbog nelinerane jakosti svijetla pri većim fragmentima, i dr. [40]. Stoga se ova metoda prvenstveno koristi za analizu sekundarnih struktura [43], mononukleotidnih polimorfizama [44], detektiranje mutacija i sekvenciranje DNA *de novo* kod kratkih lanaca DNA [45].

---

<sup>5</sup> Detekcija u stvarnom vremenu

## 2.4. Monomolekularno sekvenciranje u stvarnom vremenu

Monomolekularno sekvenciranje u stvarnom vremenu (SMRT) je metoda treće ili nove generacije sekvenciranja DNA. Koristi se tehnologijom „vodiča vala u nultom-modu“ (engl. *zero-mode waveguide*, ZMW) [46]. To je optički nanouređaj koji vodi elektromagnetske valove u optički spektar. Energija svjetlosti koja prolazi kroz vodič vala toliko je mala da se može usporediti sa valnom duljinom svjetla. ZMW omogućuje izolaciju jednog nukleotida pripojenog na lanac DNA polimerazom, koji je potom moguće optički analizirati čak i pri visokim koncentracijama. Također, uređaj detektira jednu vrstu baze, s obzirom na fluorescentnu boju kojom je ta baza označena. Metoda koristi SMRT ćeliju (slika 4.) čiji je prototip sadržavao 3000 ZMW-a. Danas SMRT ćelija sadrži 150,000 ZMW-a, od kojih 35,000-75,000 proizvodi signal koji se može očitati u sljedećih par sati. 2019. godine planirana je proizvodnja ćelije koja će sadržavati osam milijuna ZMW-a, znatno povećavajući ukupnu propusnost [47].



Slika 4. SMRT ćelija [48].

Svaka baza obojena je različitom fluorescentnom bojom, spojenom na fosfatni lanac nukleotida, koja se odcijepi nakon što se nukleotid pripoji DNA lancu pomoću polimeraze. Prema signalu fluorescentne boje određuje se vrsta pripojene baze [49]. Proces replikacije u svim ZWM-ima zabilježen je kao „film“ svjetlosnih pulseva koji se naziva kontinuirano dugo očitavanje (engl. *continuous long read*, CLR). Ako je vrijeme života polimeraze dovoljno dugo, tijekom kontinuiranog očitavanja replicira se i drugi lanac dvolančane DNA [50].

Velika prednost monomolekularnog sekvenciranja u stvarnom vremenu je duljina očitavanja sekvenci. Današnje inačice instrumenta za očitavanje, poput PacBio RS II (slika 5.), mogu imati kontinuirana očitavanja i do 60 kilobaza [51]. Nasuprot tomu, nedostaci ovog sustava su smanjena propusnost i visoka učestalost pogrešaka (11-15%) [52]. Jedna ćelija generira 0,5-1 milijardi baza, naspram instrumenata druge generacije sekvenciranja, poput Illumina HiSeq 2500, koji očitava 8 milijardi baza u vremenu od 6 dana [52].

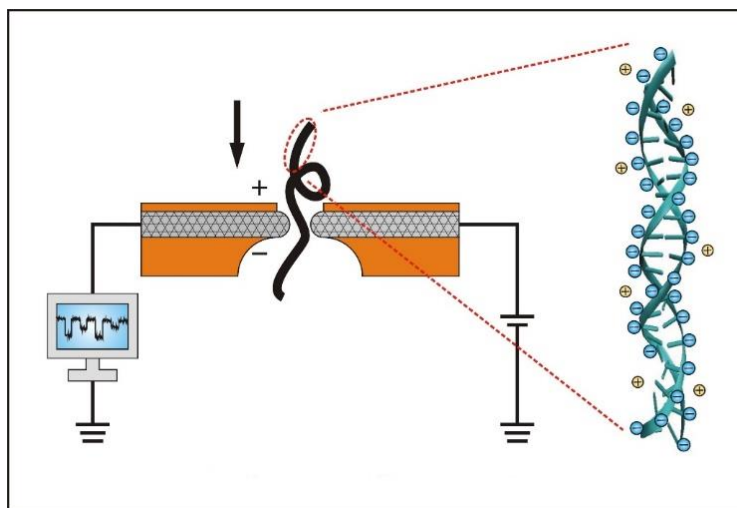


Slika 5. PacBio RS II uređaj [53].

## 2.5. Sekvenciranje pomoću nanopora

Još jedna metoda koja se ubraja u treću generaciju metoda sekvenciranja DNA je sekvenciranje pomoću nanopora. Metoda ne koristi ni PCR ni kemijsko označavanje fluorescentnim bojama kao prije navedene metode. Omogućuje jeftinu identifikaciju genotipa i mobilnost kod testiranja u stvarnom vremenu. Koristi se za brzu identifikaciju viralnih patogena [54], praćenje antibiotičke otpornosti [55], i sl.

Nanopore mogu biti kategorizirane u dvije skupine, biološke i krute. Biološke nanopore sadrže transmembranske proteine (porine) koji na membrani nanopora otvaraju prolaze kroz koje elektroforezom mogu proći molekule DNA [56]. Približavanjem i prolaskom molekula kroz pore stvaraju se naboji na površini nanopora, koji su zaslužni za detekciju sekvenci. Prva otkrivena i najviše proučavana biološka nanopora je alfa hemolizin ( $\alpha$ HL). Njezine pore širine su  $\sim 10$  nm s tri detekcijska mjesta u donjem dijelu pore, a omogućavaju detekciju svih baza [57]. S druge strane, krute nanopore umjesto membranskih proteina koristi metalne legure s porama veličine par nanometara, koje detektiraju tunelsko strujanje prilikom prolaska jednolančane molekule DNA [58] (slika 6.).



Slika 6. Shematski prikaz sekvenciranja DNA pomoću nanopora [59].

Za detekciju se koriste i ugljikove nanotube [60], te nanoelektrode na stijenkama pora [61]. Obje vrste vrste nanopora imaju svoje prednosti. Biološke nanopore imaju ujednačenu strukturu pora, te raznolikost proteina koji mogu detektirati individualne nukleotide, dok su krute nanopore dugotrajnije, izdržljivije i mogu se lako proizvesti [62].

## 2.6. Tehnike novih metoda sekvenciranja DNA

Razvojem tehnologije utvrđene su nove mogućnosti i postavljeni novi ciljevi korištenja visokopropusnih tehnika i tehnika sekvenciranja u stvarnom vremenu, koje se primjenjuju u sve više znanstvenih disciplina, poput biologije i medicine. Kako je primarni cilj ovih metoda, mapiranje ljudskog genoma, stvar prošlosti [63], znanstvenici se okreću ostvarivanju novopostavljenih ciljeva kao što su personalna genomika, analiza pojedinih genoma, analiza RNA transkripta, poboljšavanje starijih metoda u svrhu bolje identifikacije i analize regulatornih proteina, i dr. Novije metode nude mogućnosti poput karakterizacije genoma, profiliranje dijelova genoma, mRNA i malih RNA, upotrebu u mikrobiologiji i metagenomici<sup>6</sup> [63]. Trideset godina nakon otkrića Sangerove metode moguće je sekvencirati dijelove genoma u vremenu od nekoliko tjedana, dok bi upotrebom starije metode takav proces trajao nekoliko godina. Upotrebom novih tehnika za sekvenciranje, moguće je obrađivati amplificirane DNA fragmente koji ne zahtijevaju prethodno umnožavanje DNA fragmenata. Isto tako, smanjen je ukupan broj pogrešaka prilikom samog procesa, kao i mogućnost sekvenciranja većih DNA fragmenata. S druge strane, korištenje novih metoda i platformi zahtjeva ulaganje više resursa, pa su time i ukupne cijene projekata znatno više [63].

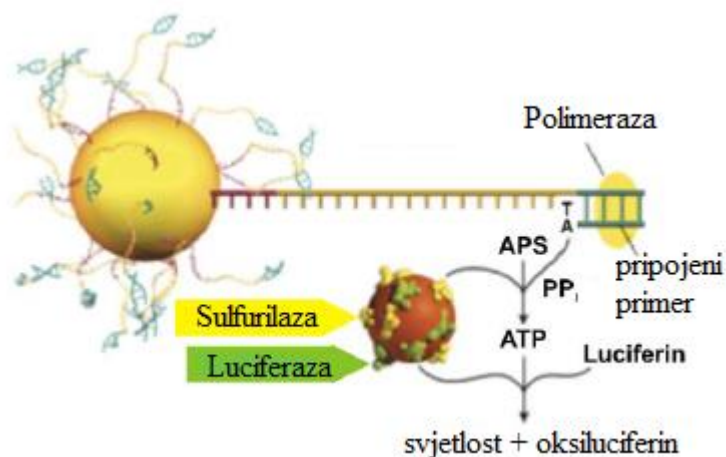
### 2.6.1. 454 GenomeSequencer

Ova je platforma jedna od prvih razvijenih novogeneracijskih uređaja za sekvenciranje DNA. Temelji se na metodi pirosekvenciranja koja je razvijena 80-ih godina prošlog stoljeća [40]. Sam instrument počinje se koristiti 2005. godine. Fragmenti DNA povezani su posebnim adapterima tako da jedan fragment čini jednu kapljicu. Potom su fragmenti amplificirani metodom PCR-a kako bi jačina svjetlosnog signala bila dovoljna za očitavanje, te se smještaju na graviranu površinu optičkog čipa, koji sadrži staklena vlakna. Potom je u kapljice dodan enzim polimeraza i primer, te jedna vrsta neoznačenog nukleotida što pokreće sintezu lanca DNA. Otpušteni pirofosfat detektira se u obliku emitiranog svjetla [63] (slika 7.).

---

<sup>6</sup> Znanost prikupljanja genetičkog materijala iz uzroka iz okoline





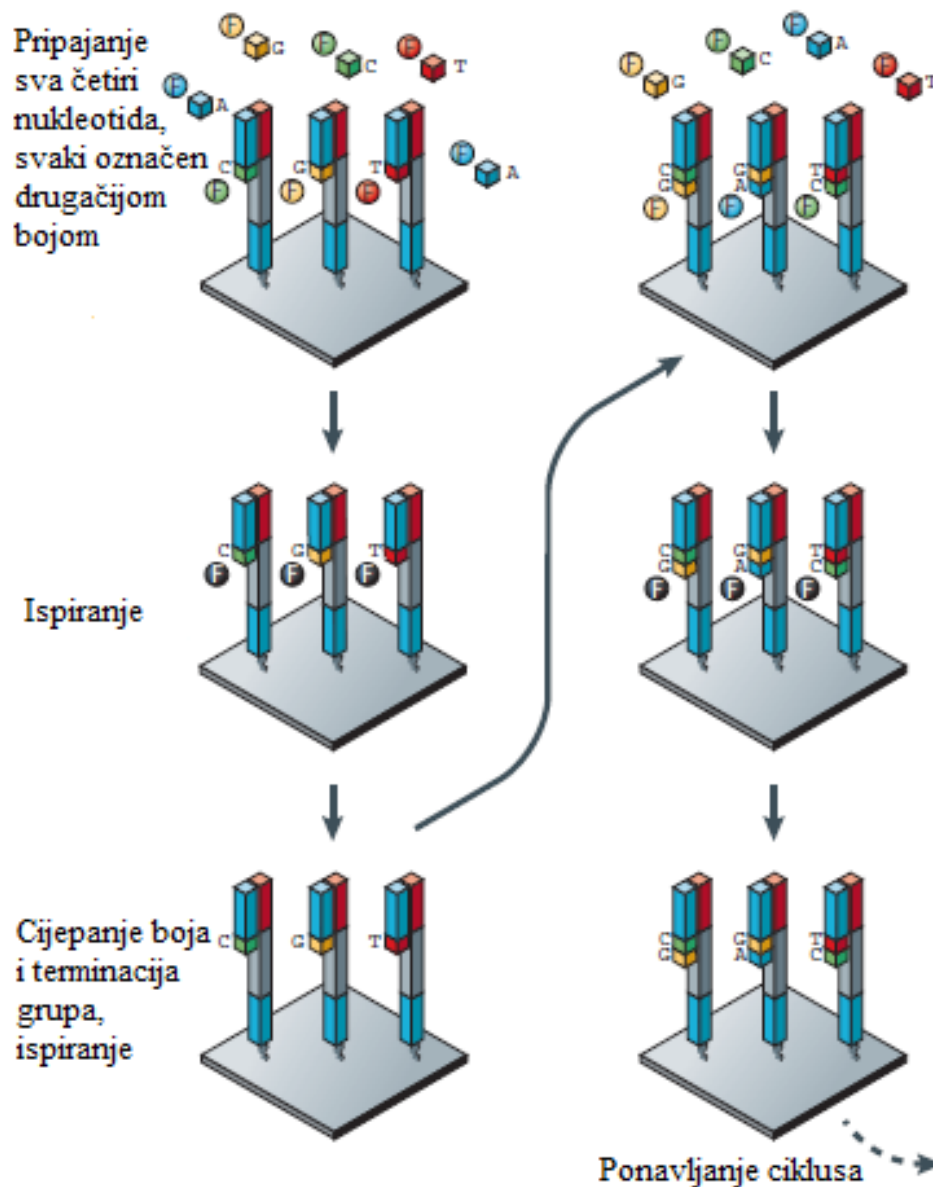
Slika 7. Shematski prikaz reakcija pirosekvenciranja na 454 GenomeSequencer instrumentu [63].

Instrument postiže mogućnost sekvenciranja fragmenata dugih od 400 do 500 baza po jednom ciklusu, te se koristi za sekvenciranje bakterijskog, životinjskog i ljudskog genoma. Nedostaci uređaja su visoka cijena pojedinih operacija i nepreciznost očitavanja pojedinih baza. Novi modeli uređaja fokusiraju se na povećanje broja izlaznih podataka, te smanjenje veličine kapljica koje se postavljaju na optičke čipove [63].

### 2.6.2. Illumina Genome Analyzer

Princip rada ovog instrumenta baziran je na sekvenciranju fragmenata kemijskom sintezom u kojoj se upotrebljavaju reverzibilni terminacijski nukleotidi za sve četiri baze, koji su označeni drugim bojama, te enzim DNA-polimeraza, koji je zaslužan za spajanje nukleotida [63]. Reverzibilni terminacijski nukleotidi modificirani su tako da dopuštaju pripajanje samo jedne baze na 3'-hidroksilni kraj po jednom ciklusu (slika 8.) [64]. Fragmenti su spojeni adapterima na oba kraja te su preneseni na čvrstu površinu. Dodavanjem PCR reagensa, adapteri na površini djeluju kao primeri za amplifikaciju PCR-om. Nakon nekoliko ciklusa PCR-a, na površini nastaju kopije jednolančanog DNA fragmenta [65]. Potom se na površinu dodaje smjesa za reakcije sekvenciranja koja sadrži primere, prije spomenute reverzibilne terminacijske nukleotide i DNA-polimerazu. Pripajanjem označenog terminacijskog nukleotida prekida se sinteza, te se pomoću CCD kamere vrši detekcija. Terminacijska grupa i fluorescentna oznaka se potom miču, te se

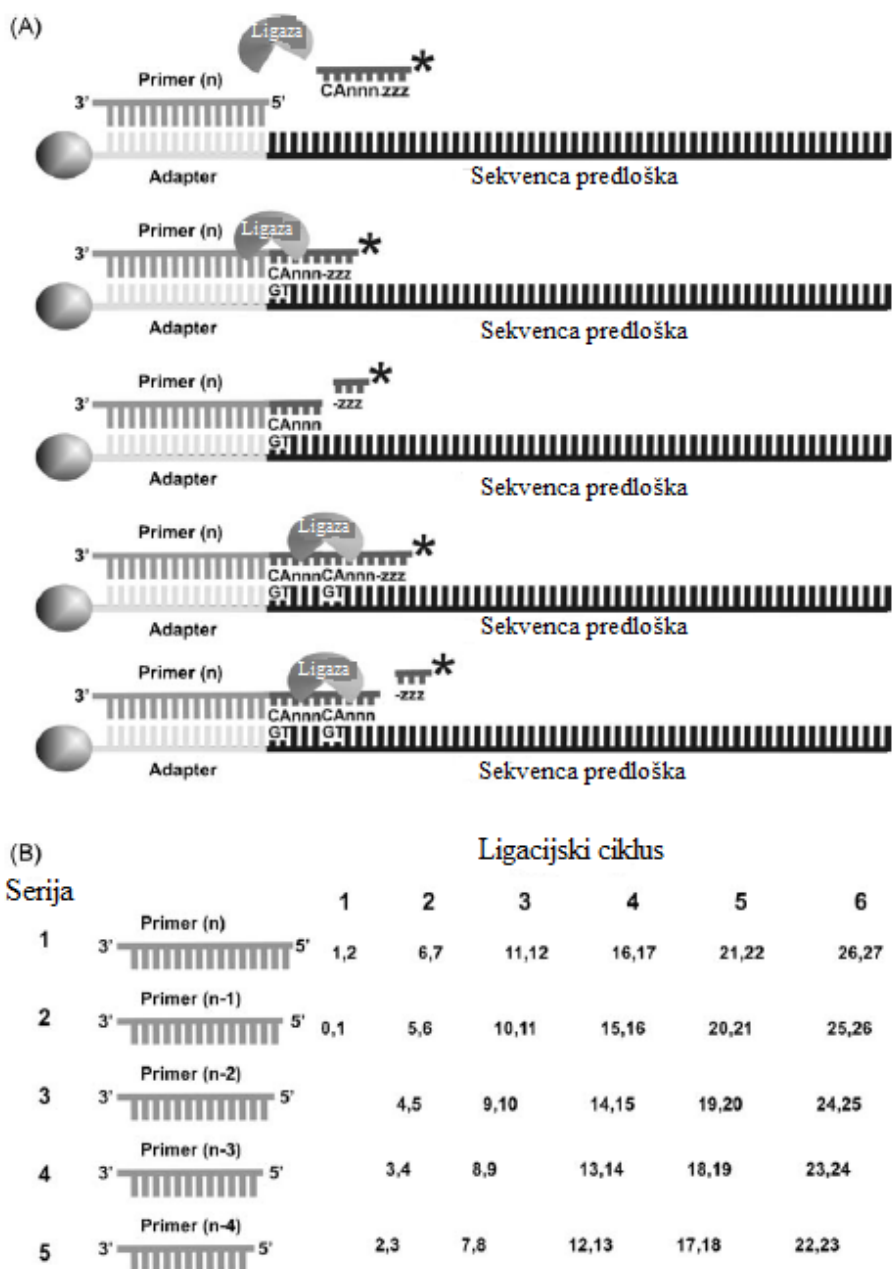
ciklus sinteze ponavlja. Duljina sekvenciranih fragmenata je oko 35 nukleotida, no broj kopija fragmenata prethodno stvorenih na čvrstoj površini dostiže broj veći od 40 milijuna. 2008. godine proizvodi se druga generacija ovog instrumenta koja ima veću površinu obrade podataka, novu optičku tehnologiju očitavanja uzoraka, te mogućnost dvostrukog (paralelnog) sekvenciranja [66].



Slika 8. Prikaz jednog ciklusa rada Illumina Genome Analyzer [67].

### 2.6.3. Sekvenciranje ligacijom i detekcijom oligonukleotida

Tehnika sekvenciranja ligacijom i detekcijom oligonukleotida (engl. *Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection*, SOLiD) koristi kemijske reakcije bazirane na ligaciji, tj. bazirane na korištenju DNA ligaze [68]. Tehnika je prikazana na slici 9. [63].



Slika 9. SOLiD sekvenciranje pomoću oligonukleotidnih oktamera (A); tablični prikaz promjene nukleotidnih baza prilikom promjene primera u ciklusu ligacije (B) [63].

Jedan fragment povezan je s jednom kapljicom amplificiranom PCR-om koja se nakon odvajanja DNA lanaca dodaje na staklenu površinu. Adapterima se dodaje primer, dok se fragmentima dodaje smjesa oligonukleotidnih oktamera (oligonukleotida koji sadrže osam određenih baza) zajedno sa ligacijskom smjesom. Dublet baza (četvrta i peta baza) u oktameru označava se fluorescentnom bojom. Oligonukleotidi se cijepaju nakon pete baze, te se ciklus ligacije ponavlja. U drugom ciklusu fluorescentnom bojom označavaju se deveta i deseta baza, u trećem četrnaesta i petnaesta i tako dalje [63]. Nakon svakog ciklusa moguća je zamjena primera, koji sadrži jednu bazu manje nego prijašnji primer, kao što je na slici 9. Svaki ciklus, baze u oktameru označuju se drugačijom fluorescentnom bojom, te se tako smanjuje broj pogrešaka. Također, sekvenciranje se obavlja u klasterima od 50 milijuna kapljica, što pridonosi visokoj propusnosti. Nova inačica ovog sustava, razvijena 2008. godine, dodatno smanjuje vrijeme sekvenciranja [63].

#### **2.6.4. HeliScope**

Mnoge metode koriste PCR amplifikaciju kako bi se stvorio dovoljno jak i prepoznatljiv svjetlosni signal potreban za detekciju fragmenata. Nedostaci ovog koraka uključuju pogreške pri sekvenciranju baza, te favoriziranje određenih sekvenci što smanjuje raznovrsnost, broj i frekvenciju fragmenata prije PCR-a. Stoga se razvijaju nove metode koji ne koriste PCR pojačanje [63]. Jedna od takvih metoda je HeliScope s instrumentom istog imena, koji sekvencira fragmente direktno iz jedne DNA molekule (engl. *Single-Molecule Sequencing*, SMS). Metoda zahtjeva vrlo osjetljiv sustav za detekciju svijetla, te mogućnost detekcije jedno-obojene molekule [69]. Fragmenti nukleinske kiseline kovalentno su hibridizirani na primer i nasumično usmjereni na staklenoj površini. Potom je dodana smjesa primera, enzima polimeraze i nukleotida označenih fluorescentnom bojom. Baza koja je pripojena sintetiziranoj niti određena je analizom emitiranog svjetlosnog signala, sekvenciranje pomoću sinteze, no bez prethodnog PCR pojačanja. Takav pristup omogućuje analizu više milijuna fragmenata istodobno. Novi pristup sekvenciranju koji pruža ova metoda primjenjuje se u testovima poput prenatalnog testa trisomije 21 (Downov sindrom), gdje se koristi majčin krvni uzorak i smanjuje rizik za fetus [70]. Nedostatak ovog sustav je nedovoljna jačina emitiranja svjetlosnog signala, zbog koje ne dolazi do detekcije, no predloženi su novootkriveni nukleotidi koji omogućavaju preciznije sekvenciranje, te smanjuju pojavu pogrešaka [63].

### 3. Zaključak

Sredinom 70-ih godina prošlog stoljeća, otkriće i usavršavanje metoda sekvenciranja DNA uvelike pridonosi otkrivanju sastava i razumijevanju ljudskog genoma. Sangerova metoda, koja pripada prvoj generaciji metoda, koristi fluorescentno označene nukleotide koji cijepaju fragmente, a rezultati su vidljivi na poliakrilamidom gelu nakon elektroforeze. Paralelno sa Sangerovom metodom, razvijena je Maxam-Gilbertova metoda koja se temelji na nasumičnom cijepanju svih vrsta nukleotidnih baza ovisno o korištenom agensu (DMS, hidrazin i dr.). Fragmenti su također detektirani elektroforezom na poliakrilamidnom gelu. Prednost Maxam-Gilbertove metode bila je u mogućnosti kontroliranja same reakcije korištenjem prethodno spomenutih agensa koji su omogućavali pojedine reakciju, kao i mogućnost detekcije fragmenata na jednom gelu (umjesto četiri gela za svaku bazu), čime je smanjeno vrijeme detekcije. Novi pogled na sekvenciranje DNA nudi metoda pirosekvenciranja. Ova metoda druge generacije temelji se na detekciji otpuštenog pirofosfata i emitiranog svjetla u reakcijama polimerizacije. Pirosekvenciranje nudi velike prednosti u odnosu na metode prve generacije. Koraci poput fluorescentnog označavanja primera i baza te gel elektroforeza potpuno su izostavljeni što omogućava bržu analizu podataka. Pojavom detekcije u stvarnom vremenu razvijene su nove metode sekvenciranja DNA, koje čine treću generaciju. Nadalje, razvija se monomolekularno sekvenciranje koje koristi samo jednu molekulu DNA. Za metodu je potreban poseban optički nanouređaj (ZMW) koji omogućava uvjete za promatranje jednog nukleotida koji se veže na lanac DNA. Svaka baza označena je drugačijom fluorescentnom bojom, čime se olakšava analiza nastalih fragmenata. Najveća prednost monomolekularne metode sekvenciranja u stvarnom vremenu je duljina očitavanja sekvenci. Uz dovoljne količine enzima, moguće je sekvenciranje oba lanca DNA molekule, što olakšava detektiranje i analizu fragmenata. S druge strane, mane ove metode uključuju nisku propusnost te veću stopu pogrešaka. Nadalje, razvijena je sljedeća novogeneracijska metoda, sekvenciranje nanoporama, koja ne koristi fluorescentno označavanje baza. Fragmenti DNA prolaze kroz nanopore i time stvaraju naboj u gustoći električnog strujanja koji se potom izračunava i analizira na uređaju. Nanopore mogu biti biološke ili krute, a svaka vrsta ima svoje prednosti. Biološke nanopore imaju ujednačenu strukturu i raznolikost membranskih proteina koji mogu detektirati pojedine baze, dok su krute nanopore dugotrajnije i izdržljivije. Paralelno s razvojem metoda sekvenciranja, patentiraju se i uređaji za detekciju i analizu fragmenata; 454 GenomeSequencer koji koristi

metodu pirosekvenciranja, Illumina (sekvenciranje sintezom), SOLiD koji koristi metodu ligacije, te HeliScope koji se bazira na monomolekularnom sekvenciranju.

Budućnost sekvenciranja DNA nudi mogućnost kombiniranja različitih metoda kako bi se nadopunile prednosti i nadomjestile mane pojedinih metoda. Monomolekularno sekvenciranje povezuje se sa visokopropusnim metodama druge generacije, što rezultira u duljim očitanjima sekvenci, visokoj propusnosti te manjoj stopi pogrešaka, te ima veliki značaj za mnoga biološka i medicinska istraživanja, poput analize uzroka bolesti, razvoja lijekova i dijagnostike, kao i istraživanja vezanih uz mikrogenomiku.

## Literatura

- [1] J.D. Watson, F.H. Crick, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **18** (1953), 123–131.
- [2] L.T.C. França, E. Carrilho, T.B.L. Kist, *Quarterly Reviews of Biophysics* **35**, 2 (2002), 169–200.
- [3] P.T. Englund, *J. Biol. Chem.* **246** (1971), 3269–3276.
- [4] F. Sanger, S. Nicklen, A.R. Coulson, *Proc. Natn. Acad. Sci.* **74** (1977), 5463–5467.
- [5] P. Russell, *iGenetics*, Pearson Education, Inc., San Francisco, 2002.
- [6] [http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/spring2003/Obenrader/sanger\\_method\\_page.htm](http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/spring2003/Obenrader/sanger_method_page.htm) (8. 9. 2018.)
- [7] <http://www.csun.edu/~hcbio027/biotechnology/lec3/sanger.html> (8. 9. 2018.)
- [8] S. Tabor, H.E. Huber, C.C. Richardson, *J. Biol. Chem.* **262** (1987), 16212–16223.
- [9] S. Tabor, C. C. Richardson, *Proc. Natn. Acad. Sci.* **84** (1987), 4767–4771.
- [10] K. Mullis, F. Fallona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, H. Elrich, *Cold Spring Harb. Symp.* **51** (1986), 263–273.
- [11] S. Beck, R.P. Alderton, *Analyt. Biochem.* **212** (1993), 498–505.
- [12] W.J. Martin, W.R. Davies, *Biotechnology* **4** (1986), 890–895.
- [13] P.M. Gillevet, *Nature* **348** (1990), 657–658.
- [14] H. Garoff, W. Ansorge, *Analyt. Biochem.* **115** (1981), 450–457.
- [15] M. D. Biggin, T.J. Gibson, G.F. Hong, *Proc. Natn. Acad. Sci.* **80** (1983), 3963–3965.
- [16] J.W. Jorgenson, K.D. Lukacs, *Science* **222** (1983), 266–272.
- [17] H. Swerdlow, K.E. Dew-Jager, K. Brady, R. Grey, N.J. Dovichi, R. Gesteland, *Electrophoresis* **13** (1992), 475–483.
- [18] X.C. Huang, M.A. Quesada, R.A. Mathies, *Analyt. Chem.* **64** (1992a), 967–972.
- [19] X.C. Huang, M.A. Quesada, R.A. Mathies, *Analyt. Chem.* **64** (1992b), 2149–2154.
- [20] J.C. Venter, M.D. Adams, E.W. Myers, P.W. Li, R.J. Mural, G.G. Sutton, H.O. Smith, M. Yandell, C.A. Evans, R.A. Holt, J.D. Gocayne, P. Amanatides, R.M. Ballew, D.H. Huson, J.R. Wortman, Q. Zhang, C.D. Kodira, X.H. Zheng, L. Chen, M. Skupski, G. Subramanian, P.D. Thomas, J. Zhang, G.L. Gabor Miklos, C. Nelson, S. Broder, A.G. Clark, J. Nadeau, V.A. McKusick, N. Zinder, A.J. Levine, R.J. Roberts, M. Simon, C. Slayman, M. Hunkapiller, R. Bolanos, A. Delcher, I. Dew, D. Fasulo, M. Flanigan, L. Florea, A. Halpern, S. Hannenhalli, S. Kravitz, S. Levy, C. Mobarry, K. Reinert, K. Remington, J. Abu-

Threideh, E. Beasley, K. Biddick, V. Bonazzi, R. Brandon, M. Cargill, I. Chandramouliswaran, R. Charlab, K. Chaturvedi, Z. Deng, V. Di Francesco, P. Dunn, K. Eilbeck, C. Evangelista, A.E. Gabrielian, W. Gan, W. Ge, F. Gong, Z. Gu, P. Guan, T.J. Heiman, M.E. Higgins, R.R. Ji, Z. Ke, K.A. Ketchum, Z. Lai, Y. Lei, Z. Li, J. Li, Y. Liang, X. Lin, F. Lu, G.V. Merkulov, N. Milshina, H.M. Moore, A.K. Naik, V.A. Narayan, B. Neelam, D. Nusskern, D.B. Rusch, S. Salzberg, W. Shao, B. Shue, J. Sun, Z. Wang, A. Wang, X. Wang, J. Wang, M. Wei, R. Wides, C. Xiao, C. Yan, A. Yao, J. Ye, M. Zhan, W. Zhang, H. Zhang, Q. Zhao, L. Zheng, F. Zhong, W. Zhong, S. Zhu, S. Zhao, D. Gilbert, S. Baumhueter, G. Spier, C. Carter, A. Cravchik, T. Woodage, F. Ali, H. An, A. Awe, D. Baldwin, H. Baden, M. Barnstead, I. Barrow, K. Beeson, D. Busam, A. Carver, A. Center, M.L. Cheng, L. Curry, S. Danaher, L. Davenport, R. Desilets, S. Dietz, K. Dodson, L. Doup, S. Ferreira, N. Garg, A. Gluecksmann, B. Hart, J. Haynes, C. Haynes, C. Heiner, S. Hladun, D. Hostin, J. Houck, T. Howland, C. Ibegwam, J. Johnson, F. Kalush, L. Kline, S. Koduru, A. Love, F. Mann, D. May, S. McCawley, T. McIntosh, I. McMullen, M. Moy, L. Moy, B. Murphy, K. Nelson, C. Pfannkoch, E. Pratts, V. Puri, H. Qureshi, M. Reardon, R. Rodriguez, Y.H. Rogers, D. Romblad, B. Ruhfel, R. Scott, C. Sitter, M. Smallwood, E. Stewart, R. Strong, E. Suh, R. Thomas, N.N. Tint, S. Tse, C. Vech, G. Wang, J. Wetter, S. Williams, M. Williams, S. Windsor, E. Winn-Deen, K. Wolfe, J. Zaveri, K. Zaveri, J.F. Abril, R. Guigó, M.J. Campbell, K.V. Sjolander, B. Karlak, A. Kejariwal, H. Mi, B. Lazareva, T. Hatton, A. Narechania, K. Diemer, A. Muruganujan, N. Guo, S. Sato, V. Bafna, S. Istrail, R. Lippert, R. Schwartz, B. Walenz, S. Yooseph, D. Allen, A. Basu, J. Baxendale, L. Blick, M. Caminha, J. Carnes-Stine, P. Caulk, Y.H. Chiang, M. Coyne, C. Dahlke, A. Mays, M. Dombroski, M. Donnelly, D. Ely, S. Esparham, C. Fosler, H. Gire, S. Glanowski, K. Glasser, A. Glodek, M. Gorokhov, K. Graham, B. Gropman, M. Harris, J. Heil, S. Henderson, J. Hoover, D. Jennings, C. Jordan, J. Jordan, J. Kasha, L. Kagan, C. Kraft, A. Levitsky, M. Lewis, X. Liu, J. Lopez, D. Ma, W. Majoros, J. McDaniel, S. Murphy, M. Newman, T. Nguyen, N. Nguyen, M. Nodell, S. Pan, J. Peck, M. Peterson, W. Rowe, R. Sanders, J. Scott, M. Simpson, T. Smith, A. Sprague, T. Stockwell, R. Turner, E. Venter, M. Wang, M. Wen, D. Wu, M. Wu, A. Xia, A. Zandieh, X. Zhu, *Science* **291** (2001) 1304–1351.

[21] M. Karas, F. Hillenkamp, *Analyt. Chem.* **60** (1988), 2301–2303.

[22] M. Karas, U. Bahr, *Analyt. Chem.* **9** (1990), 321–325.

[23] A.M. Maxam, W. Gilbert, *Proc. Natn. Acad. Sci.* **74** (1977), 560–564.

[24] W. Ansorge, A. Rosenthal, B. Sproat, C. Schwager, J. Stegemann, H. Voss, *Nucleic Acids Res.* **16** (1988), 2203–2206.



- [25] R. Tizard, R.L. Cate, K.L. Ramachandran, M. Wusk, J.C. Voyta, O.J. Murphy, I. Bronstein, *Proc. Natn. Acad. Sci.* **87** (1990), 4514–4518.
- [26] A.M. Maxam, *Fed. Proc.* **39** (1980) 2830–2836.
- [27] A. Wada, *Nature* **307** (1984), 193–193.
- [28] S.A. Chuvpilo, V.V. Kravchenko, *FEBS Lett.* **179** (1984), 34–36.
- [29] A. Rosenthal, *Nucleos. Nucleot.* **6** (1987), 419–420.
- [30] H. Voss, C. Schwager, U. Wirkner, B. Sproat, J. Zimmermann, A. Rosenthal, H. Erfle, J. Stegemann, W. Ansorge, *Nucleic Acids Res.* **17** (1989), 2517–2527.
- [31] P. Jagadeeswaran, R.K. Kaul, *Genet. Anal.: Tech. Appl.* **3** (1986), 79–85.
- [32] B.J.B. Ambrose, R.C. Pless, *Meth. Enzym.* **152** (1987), 522–539.
- [33] E.J. Boland, A. Pillai, M.W. Odom, P. Jagadeeswaran, *Bio-Techniques* **16** (1994), 1088–1095.
- [34] G.M. Church, W. Gilbert, *Proc. Natn. Acad. Sci.* **81** (1984), 1991–1995.
- [35] E. W. Sayers, M.J. Waring, *Biochemistry* **32** (1993), 9094–9107.
- [36] S. Ferraboli, R. Negri, E. Di Mauro, S. Barlati, *Analyt. Biochem.* **214** (1993), 566–570.
- [37] N.R. Isola, S.L. Allman, V.V. Golovlov, C.H. Chen, *Analyt. Chem.* **71** (1999), 2266–2269.
- [38] P. Nyrén, A. Lundin, *Analyt. Biochem.* **151** (1985), 504–509.
- [39] P. Nyrén, *Analyt. Biochem.* **167** (1987), 235–238.
- [40] M. Ronaghi, S. Karamohamed, B. Petterson, M. Uhlén, P. Nyrén, *Analyt. Biochem.* **242** (1996), 84–89.
- [41] M. Ronaghi, M. Uhlén, P. Nyrén, *Science* **281** (1998), 363–365.
- [42] M. Ronaghi, *Genome Res.* **11** (2001), 3–11.
- [43] T. Nordstrom, M. Ronaghi, L. Forsberg, U. De Faire, R. Morgenstern, P. Nyrén, *Biotechnol. Appl. Biochem.* **31** (2000), 107–112.
- [44] A.C. Garcia, A. Ahmadian, B. Gharizadeh, J. Lundeberg, M. Ronaghi, P. Nyrén, *Gene* **253** (2000), 249–257.
- [45] T. Nordstrom, K. Nourizad, M. Ronaghi, P. Nyrén, *Analyt. Biochem.* **282** (2000), 186–193.
- [46] M.J. Levene, *Science* **299** (2003), 682–686.
- [47] A. Rhoads, K.F. Au, *Genomics Proteomics Bioinformatics* **13** (2015), 278–289.
- [48] <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1672022915001345> (19. 9. 2018.)
- [49] J. Eid, A. Fehr, J. Gray, K. Luong, J. Lyle, G. Otto, P. Peluso, D. Rank, P. Baybayan, B. Bettman, A. Bibillo, K. Bjornson, B. Chaudhuri, F. Christians, R. Cicero, S. Clark, R.

- Dalal, A. Dewinter, J. Dixon, M. Foquet, A. Gaertner, P. Hardenbol, C. Heiner, K. Hester, D. Holden, G. Kearns, X. Kong, R. Kuse, Y. Lacroix, S. Lin, P. Lundquist, C. Ma, P. Marks, M. Maxham, D. Murphy, I. Park, T. Pham, M. Phillips, J. Roy, R. Sebra, G. Shen, J. Sorenson, A. Tomaney, K. Travers, M. Trulson, J. Vieceli, J. Wegener, D. Wu, A. Yang, D. Zaccarin, P. Zhao, F. Zhong, J. Korlach, S. Turner, *Science* **323** (2009), 133–138.
- [50] S. Koren, A.M. Phillippy, *Curr Opin Microbiol*, **23** (2015), 110–120.
- [51] <http://www.pacb.com/smrt-science/smrt-sequencing/read-lengths/> (19. 9. 2018.)
- [52] [http://www.illumina.com/systems/hiseq\\_2500\\_1500/performance\\_specifications.htm](http://www.illumina.com/systems/hiseq_2500_1500/performance_specifications.htm) (19. 9. 2018.)
- [53] <https://www.genomescan.nl/portfolio/pacbio/> (19. 9. 2018.)
- [54] A.L. Greninger, S.N. Naccache, S. Federman, G. Yu, P. Mbala, V. Bres, D. Stryke, J. Bouquet, S. Somasekar, J.M. Linnen, R. Dodd, P. Mulembakani, B.S. Schneider, J.-J. Muyembe-Tamfum, S.L. Stramer, C.Y. Chiu, *Genome Med.* **7** (2015), 2–15.
- [55] M.D. Cao, D. Ganesamoorthy, A. Elliott, H. Zhang, M.A. Cooper, L.J. Coin, *GigaScience* **5** (2016), 2–18.
- [56] D. Stoddart, A. Heron, E. Mikhailova H. Maglia, H. Bayley, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106** (2009), 7702–7707.
- [57] R. Purnell, K. Mehta, J. Schmidt, *Nano Letters* **8** (2008), 3029–3034.
- [58] S. Chang, S. Huang, J. He, F. Liang, P. Zhang, S. Li, X. Chen, O. Sankey, S. Lindsay, *Nano Lett.* **10** (2010), 1070–1075.
- [59] <https://phys.org/news/2013-12-gene-sequencing-future.html> (19. 9. 2018.)
- [60] E.S. Sadki, S. Garaj, D. Vlassarev, J.A. Golovchenko, D. Branton, *J. Vac. Sci. Technol.* **29** (2011), 5–5.
- [61] A. Ivanov, E. Instuli, C. McGilvery, G. Baldwin, D. McComb, T. Albrecht, J. Edel, *Nano Lett.* **11** (2011), 279–285.
- [62] Z. Liu, Y. Wang, T. Deng, O. Chen, *J. Nanomater.* (2016), 1–13.
- [63] W.J. Ansorge, *N. Biotechnol.* **25** (2009), 195-203.
- [64] G. Turcatti, A. Romieu, M. Fedurco, A.P. Tairi, *Nucleic Acids Res.* **36** (2008), 3–16.
- [65] C. Adessi, G. Matton, G. Ayala, G. Turcatti, J.-J. Mermoud, P. Mayer, E. Kawashima, *Nucleic Acids Res.* **28** (2000), 2-8.
- [66] S.C. Schuster, *Nat. Methods* **5** (2008), 11–21.
- [67] M.L. Metzker, *Nat. Rev. Genet.* **11** (2010), 31-46.
- [68] J. Shendure, G.J. Porreca, N.B. Reppas, X. Lin, J.P. McCutcheon, A.M. Rosenbaum, M.D. Wang, K. Zhang, R.D. Mitra, G.M. Church, *Science* **309** (2005), 1728-1732.

[69] I. Braslavsky, B. Hebert, E. Kartalov, S.R. Quake, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100** (2003), 3960–3964.

[70] S.R. Quake, H.C. Fan, Y.J. Blumenfeld, U. Chitkara, L. Hudgins, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105** (2008), 16266–16271.