

# Metode sekvencioniranja DNA

---

Lacković, Tereza

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:439174>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Tereza Lacković

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

# **Metode sekvenciranja DNA**

## **Završni rad**

Rad je izrađen u Zavodu za biokemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Marko Močibob

Zagreb, 2020. godina.





Datum predaje prve verzije Završnog rada:

15. srpnja 2020.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

Mentor rada: doc. dr. sc. Marko Močibob

Potpis:



## Sadržaj

<b>§ SAŽETAK</b>	<b>VII</b>
<b>§ 1. UVOD</b>	<b>1</b>
<b>§ 2. METODE SEKVENCIRANJA DNA</b>	<b>4</b>
<b>2.1. Metode sekvenciranja prve generacije</b>	<b>4</b>
2.1.1. Sangerova metoda sekvenciranja	4
2.1.2. Maxam i Gilbertova metoda	8
<b>2.2. Metode sekvenciranja druge generacije</b>	<b>13</b>
2.2.1. Pirosekvenciranje	13
2.2.2. Sekvenciranje reverzibilnom terminacijom	14
<b>2.3. Metode sekvenciranja treće generacije</b>	<b>16</b>
2.3.1. Sekvenciranje pojedinačnih molekula u stvarnom vremenu	16
2.3.2. Sekvenciranje pomoću nanopora	18
<b>2.4. Sekvenciranje genoma</b>	<b>22</b>
<b>§ 3. LITERATURNI IZVORI</b>	<b>XXVIII</b>







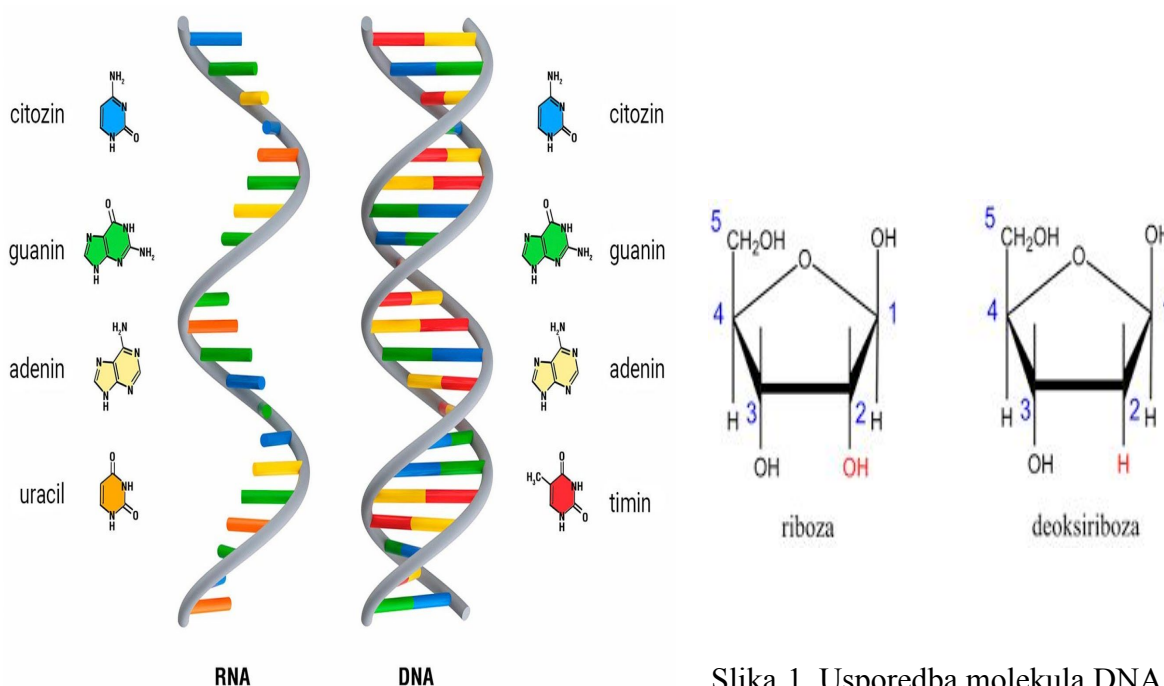
## § Sažetak

Od otkrića strukture DNA, znanstvenici su uložili velike napore kako bi se točno utvrdio redoslijed nukleotida u molekuli. Ovaj pregled obuhvaća povijesnu pozadinu poboljšanja tehnologija sekvenciranja DNA koje su pratile glavne prekretnice u sekvenciranju i sklapanju genoma, u rasponu od ranih metoda sekvenciranja koje su uključivale Sangerovu, te Maxam i Gilbertovu metodu, do platformi za sekvenciranje sljedeće generacije. Od metoda druge generacije opisano je pirosekvenciranje i sekvenciranje reverzibilnom terminacijom (platforma *Illumina*). Zatim slijede nove prednosti i izazovi postojećih tehnologija i pristupa, zajednički poznatih kao sekvenciranje treće generacije. Treća generacija obuhvaća sekvenciranje pojedinačnih molekula u stvarnom vremenu (*Pacific Biosciences*), te sustave nanopora. Kako su ta tehnička dostignuća popraćena napretkom u analitičkim metodama, također je dan pregled alata koji su trenutno korišteni u sklapanju *de novo* genoma.<sup>6</sup>



## § 1. UVOD

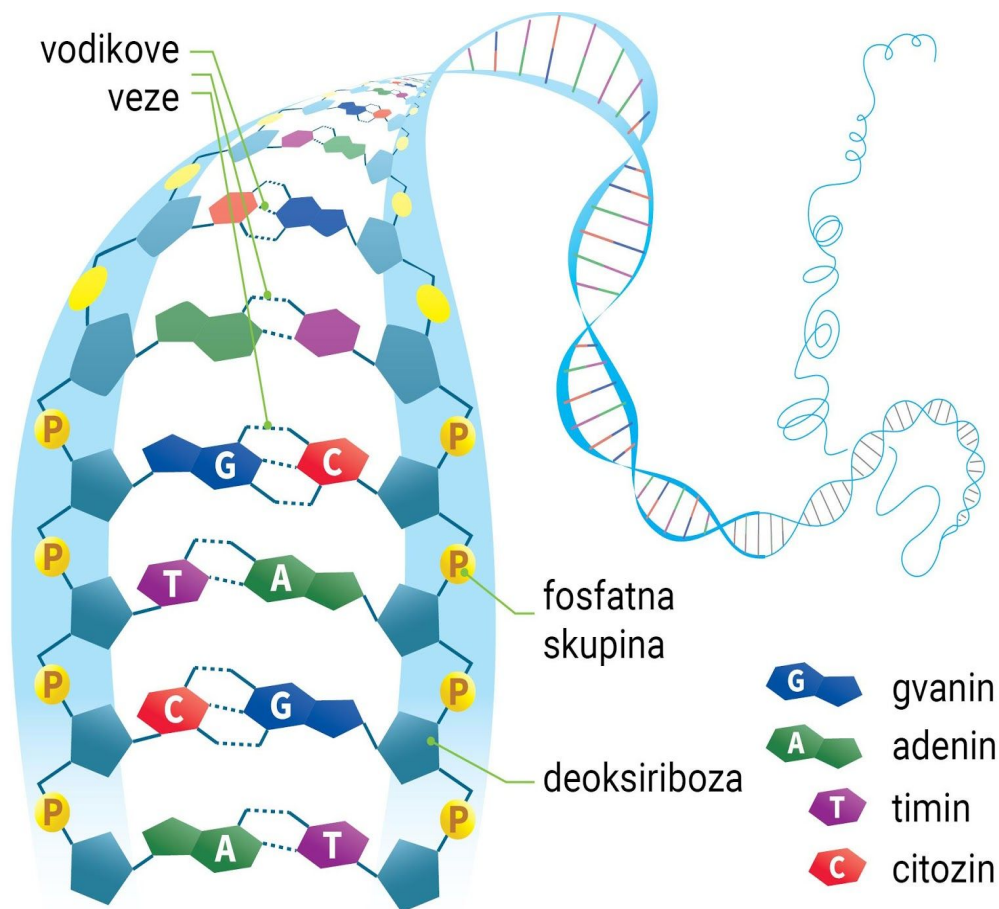
Otkrivanje strukture DNA započelo je 1909.g. rusko-američki biokemičar Phoebus Levene identificirao je šećer kao dio nukleinske kiseline, a 1929.g. otkrio je veliku kemijsku razliku između RNA i DNA: RNA sadrži šećer ribozu, a DNA sadrži deoksiribozu (slika 1). Austrijsko-američki biokemičar Erwin Chargaff pokazao je da DNA u svojoj strukturi sadrži jednake količine baza adenina (A) i timina (T), te jednake količine gvanina (G) i citozina (C). Zatim su engleski fizičar Maurice Wilkins i engleska kemičarka Rosalind Franklin bombardirali DNA X-zrakama primjenom tehnike nazvane difrakcija rendgenskih zraka. Ta tehnika omogućila je informacije o strukturi DNA. Izuzetna simetrija DNA govorila je R. Franklin da je molekula spiralna i otkrila je položaj fosfata. R. Franklin pružila je trag koji će dokazati značaj u otkrivanju strukture DNA Watsonu i Cricku. U međuvremenu, Watson i Crick, sigurni da okosnicu DNA čine fosfat i šećer, usmjerili su pozornost na baze. Sparivanjem baza adenin i timin, te gvanin i citozin, primijetili su slične oblike koji su međusobno komplementarni. Tako su 1953.g. predložili dvostruku spiralu kao strukturni element (slika 2).<sup>1</sup>



Slika 1. Usporedba molekula DNA i RNA

(preuzeto i prilagođeno iz ref. 3)

DNA je polimer i sastoji se od niza nukleotida. Pojedini nukleotid građen je od jednog šećera deoksiriboze, jedne fosfatne skupine (kojoj je atom fosfata vezan na četiri atoma kisika) i jedne dušične baze.<sup>1</sup> Adenin i gvanin su purini koji imaju dvo-prstenastu strukturu. Citozin i timin su pirimidini koji imaju jedno-prstenastu strukturu.<sup>2</sup> Ti specifični parovi purin-pirimidin se nazivaju komplementarni bazni parovi. Zatim se nukleotidi u dugačke lance povezuju kovalentnim fosfodiesterskim vezama. Dva takva lanca nukleotida antiparalelne orijentacije čine simetričnu dvostruku spiralu DNA.<sup>1</sup>



Slika 2. Struktura molekule DNA (preuzeto i prilagođeno iz ref. 3)

Sekvenciranje DNA je metoda koja omogućuje odrediti osnovni slijed nukleotida u molekuli DNA.<sup>4</sup> Prvu sekvencu proteina, inzulina, odredio je 1953.g. Fred Sanger, to je ujedno značilo i prvo sekvenciranje biološke molekule.<sup>5,6</sup> Do danas su razvijene brojne metode sekvenciranja DNA koje se razlikuju po svojstvima, poput načela sekvenciranja, propusnosti, točnosti, brzini, duljini čitanja sekvenci DNA, cijeni, te pripremi samih uzoraka za analizu.<sup>7,8</sup> Podijeljene su u tri generacije, prvu generaciju čine Maxam i Gilbertova metoda, te Sangerova metoda, u drugu generaciju ubrajamo pirosekvenciranje, sekvenciranje reverzibilnom terminacijom (sustav *Illumina*), dok treću generaciju čine metode poput sekvenciranja pojedinačnih molekula u stvarnom vremenu, zvano SMRT sekvenciranje (sustav *PacBio*) i sekvenciranje pomoću nanopora.<sup>8</sup>

Metode sekvenciranja DNA pridonose u razvoju brojnih područja kao što su biotehnologija, forenzika, virologija, genetika, molekularna biologija, medicinska dijagnostika i mnogih drugih. U nastavku su opisane pojedine metode sekvenciranja prve, druge i treće generacije.<sup>7,8</sup>

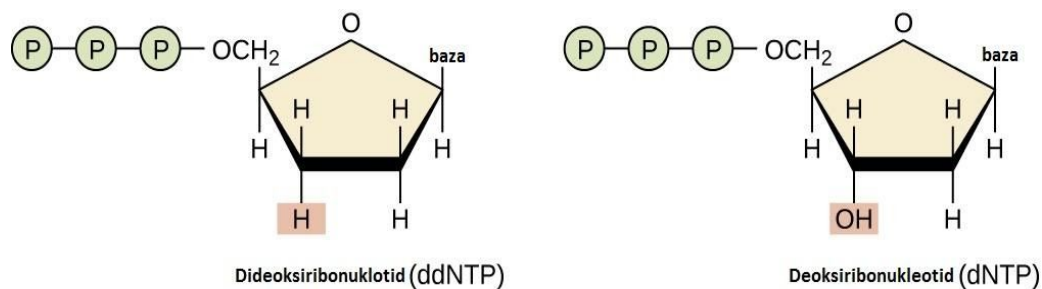
## § 2. METODE SEKVENCIRANJA DNA

### 2.1. Metode sekvenciranja prve generacije

#### 2.1.1. Sangerova metoda sekvenciranja

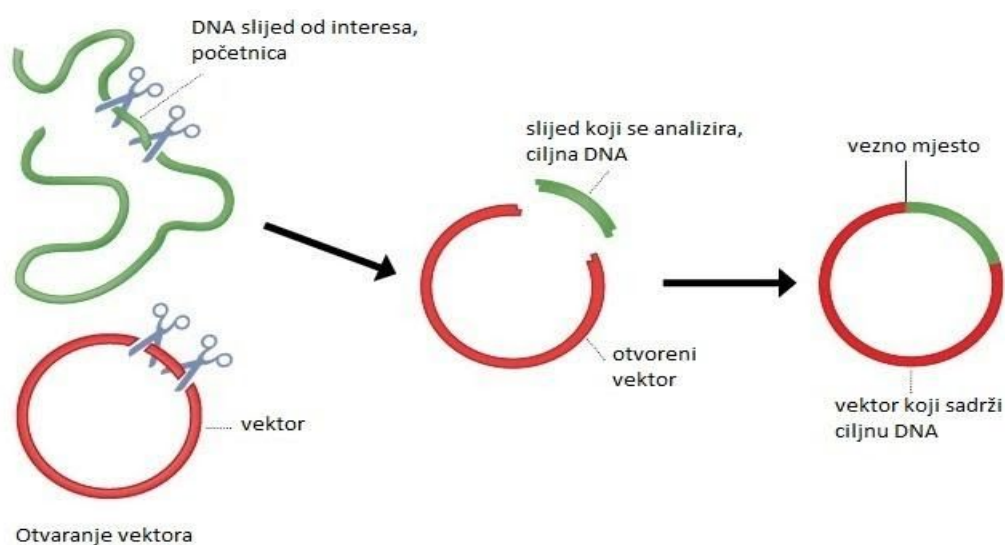
Sekvenciranje DNA procvjetalo je sredinom 1970-ih. Friedrich Sanger i Coulson, 1975. godine, razvili su „plus i minus“ metodu za sekvenciranje DNA i upotrijebili su je za određivanje dvije kratke regije u jednolančanom DNA bakteriofagu  $\Phi$ X174. U ovoj se metodi koriste četiri reakcijske smjese, a svaka sadrži uzorak DNA, početnicu, DNA-polimerazu i četiri deoksiribonukleotida, od kojih je jedna radioaktivno obilježena. Te reakcije generiraju populaciju novo sintetiziranih nizova DNA različite duljine. Reakcije se zatim podijele u četiri para smjesa „plus“ i „minus“. „Minus“ smjese sadrže tri deoksiribonukleozid-trifosfata (dNTP), i kao razlog toga, DNA lanac se produljuje do nukleotida koji nedostaje. U reakcijama „plus“ dodaje se samo jedan nukleotid svakom od četiri alikvota i koristi se T4 DNA-polimeraza. Egzonukleazna aktivnost T4 DNA-polimeraze je iskorištena da bi se razgradila DNA od 3'-kraja do nukleotida koji je dodan u reakciju. Produkti osam reakcija nanose se na poliakrilamidne gelove, a za određivanje redoslijeda nukleotida koristi se udaljenost migracije.<sup>6</sup>

Sanger je 1977. godine razvio novu metodu, poznatu kao dideoksi sekvenciranje ili enzimska metoda završavanja lanca, koja je mogla dekodirati fragmente od otprilike četiri stotine baza na dan.<sup>4,9</sup> Ova se metoda i danas široko koristi i temelji se na uporabi dideoksiribonukleotida (ddNTP) koji su identični deoksiribonukleotidima (dNTP), s razlikom što ddNTP-ovima nedostaje hidroksilna (-OH) skupina na trećem ugljikovom atomu riboze (slika 3).<sup>9</sup> (Napomena: Prefiks dideoksi- odnosi se na činjenicu da postoje dva (di) uklonjena (de) kisika (oksi) u usporedbi s ribozom; riboza ima -OH skupine na drugom i trećem položaju). Sanger je obrazložio da ako se dideoksiribonukleotid doda na rastući lanac DNA, lanac ne može rasti, jer ddNTP-u nedostaje -OH skupina na trećem ugljikovom atomu. Uključivanje ddNTP-a u rastući lanac stoga izaziva prekid njegovog produljivanja.<sup>4</sup>



Slika 3. Usporedba strukture dideoksiribonukleotida i deoksiribonukleotida (preuzeto i prilagođeno iz ref.10)

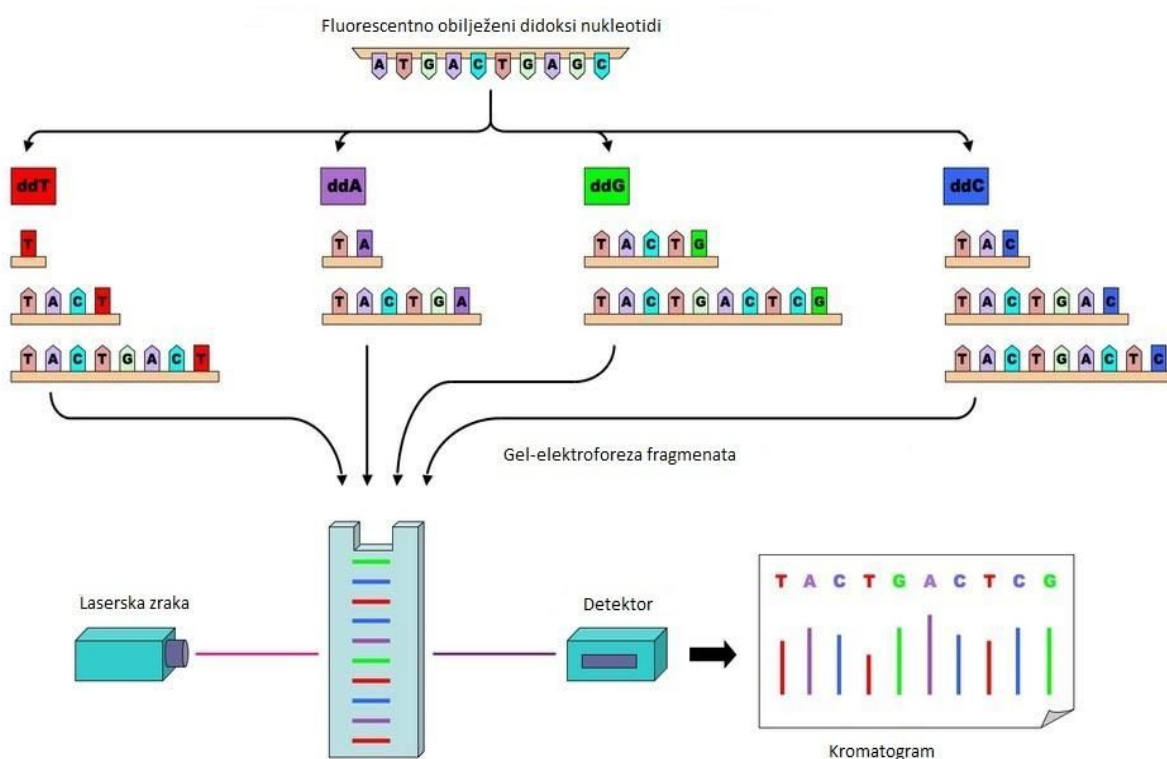
Prije sekvenciranja DNA, segment DNA koji će biti sekvenciran mora se dobiti u velikim količinama. To se postiže kloniranjem gena ili tehnikama PCR-a. Na slici 4, segment koji će biti sekvenciran (koji ćemo nazvati ciljna DNA) kloniran je u vektor na određenom mjestu. Cilj eksperimenta je odrediti bazni slijed ciljne DNA koji je umetnut pored veznog mjesta za početnicu. U eksperimentu prikazanom na slici 4, vektorska DNA je od virusa zvanog M13. Kada se unese u stanicu domaćina, virus će proizvesti jednolančanu DNA kao dio svog životnog ciklusa.<sup>4</sup>



Slika 4. Prikaz segmenta DNA koji je kloniran u virusni vektor na određenom mjestu (preuzeto i prilagođeno iz ref 4.)



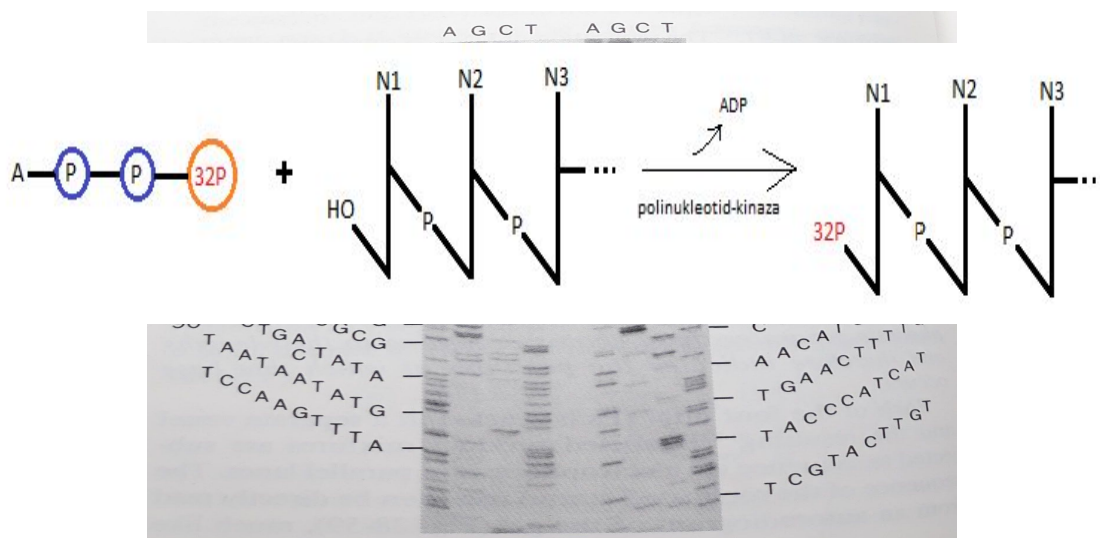
Koraci koji slijede u sekvenciranju DNA (slika 5). Prvo, uzorak koji sadrži mnogo primjeraka jednolančane DNA pomiješan je s početnicama koje će se vezati na vezno mjesto za početnice. Nakon postupka vezanja početnica za svoje vezno mjesto, sve četiri vrste deoksiribonukleotida i DNA-polimeraze se zatim dodaju veznim fragmentima DNA, a smjesa je podijeljena u četiri odvojene epruvete. Pored četiri dNTP-a, svaka od četiri epruvete ima nisku koncentraciju različitog dideoksiribonukleotida. Epruvete se zatim inkubiraju kako bi se omogućilo da DNA-polimeraza napravi lance komplementarne sekvenci ciljne DNA. U trećoj epruveti, koja u ovom primjeru sadrži ddTTP, može se povremeno prekinuti lanac na šestom i trinaestom položaju novo sintetiziranog lanca DNA, ako se ddT ugradi na bilo kojem od ovih mjesta. Komplementarna baza adenin (A) nalazi se na šestom i trinaestom položaju u ciljnoj DNA. Stoga bismo očekivali da u ovoj epruveti napravimo nekoliko DNA lanaca koji će se prekinuti na šestom ili trinaestom položaju. Isto tako, u drugoj epruveti, ddATP može uzrokovati prekid lanca samo na drugom, sedmom, osmom ili jedanaestom položaju, jer se timini (T) nalaze na odgovarajućim položajima u ciljnom lancu. Unutar četiri epruvete načinjene su smjese DNA lanaca različitih duljina. Ti se lanci DNA mogu odvojiti prema njihovoj duljini tako što ćemo ih nanositi na akrilamidni gel. Kraći lanci se brže pomiču na dno gela od duljih. Da bi se otkrili tek napravljeni lanci DNA, svakoj reakciji dodaju se male količine radioaktivno obilježenih dNTP-ova. To omogućuje vizualizaciju vrpce kada se gel izloži rendgenskom filmu. Na slici 5, lanci DNA u četiri epruvete odvajali su se u zasebnim jažicama na akrilamidnom gelu. Budući da znamo koji je ddNTP dodan u svaku epruvetu, također znamo koja je baza na kraju svakog lanca DNA i podudaramo taj niz s duljinom lanca. Čitanje niza baze odozdo prema gore slično je penjanju ljestvama. Stoga se niz koji je dobiven ovom metodom naziva ljestvicom za sekvenciranje (slika 6).<sup>4</sup>



Slika 5. Protokol sekvenciranja DNA dideoksi metodom ( preuzeto i prilagođeno iz ref 22.)

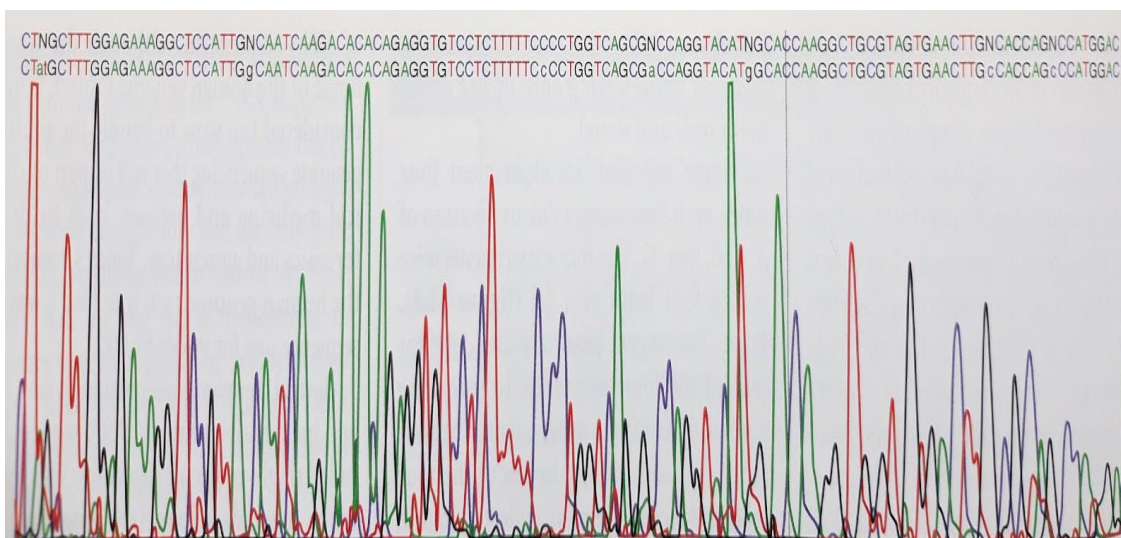
Važna inovacija u načinu dideoksi sekvenciranja je automatizirano sekvenciranje. Umjesto četiri odvojene reakcijske smjese, s jednom vrstom ddNTP-a u svakoj smjesi, automatsko sekvenciranje koristi jednu reakcijsku smjesu koja sadrži sve četiri vrste ddNTP-a. Međutim, svaka vrsta ddNTP-a (ddA, ddT, ddG i ddC) ima pričvršćen fluorescentni biljeg različite fluorescencije. Nakon inkubacije ciljne DNA s ddNTP-ovima i DNA-polimerazom, uzorak se nanosi na gel. U automatiziranom sekvenciranju uzorak se nanosi na vrh gela, a zatim se fragmenti odvajaju elektroforezom. Elektroforeza se nastavlja sve dok svaka vrpca ne izađe s dna gela. Shematski primjer vrpce automatskog sekvenciranja prikazan je na slici 6. Kako se svaka vrpca odvaja, laser pobuđuje fluorescentnu boju, a fluorescentni detektor bilježi količinu emisije fluorescencije. Detektor očitava razinu fluorescencije na četiri valne duljine, što odgovara četiri boje. Primjer ispisa iz fluorescentnog detektora prikazan je na slici 7. Kao što se vidi na slici 7, vrhovi fluorescencije odgovaraju DNA sekvenci koja je komplementarna ciljnoj DNA.<sup>4</sup>

Predvodnik u automatiziranom Sanger sekvenciranju je *Applied Biosystems*, sad dio *ThermoFisher-a*.



Slika 6 . Prikaz vrpce sekvenciranja dobiven autoradiografijom (preuzeto i prilagođeno iz ref 4.)

Slika 7. Primjer ispisa iz fluorescentnog detektora (preuzeto i prilagođeno iz ref 4.)



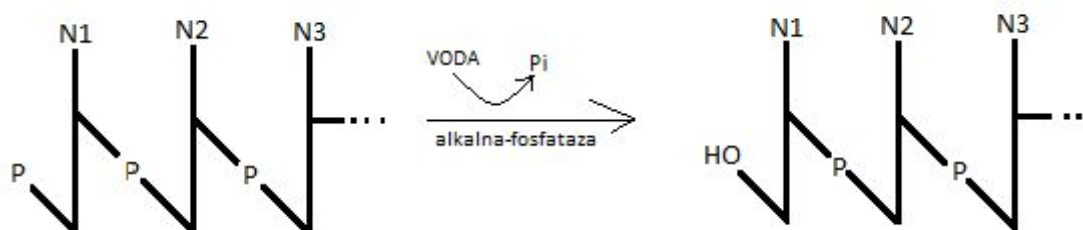
### 2.1.2. Maxam i Gilbertova metoda

Nakon 1975.g. razvijeno je nekoliko metoda za brzo sekvenciranje dugih lanaca DNA. Metoda kemijskog cijepanja Allana Maxama i Waltera Gilberta široko se koristi i u velikoj je mjeri odgovorna za ogroman broj sekvenciranih nizova DNA.

Prvi korak u metodi kemijskog cijepanja je radioaktivno obilježavanje jednog kraja DNA, obično obilježen 5' kraj, s  $^{32}\text{P}$ . Ako DNA već ima obilježenu 5' fosfatnu skupinu, ona se prvo mora ukloniti tretiranjem s alkalnom-fosfatazom iz bakterije Escherichie-coli (slika 8).<sup>12</sup>

Slika 8. Prikaz djelovanja alkalne fosfataze i polinukleotid-kinaze iz bakterije *Escherichiae-coli* (preuzeto i prilagođeno iz ref 12.)

Potom je 5' kraj označen u reakciji s  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP-om, katalizirana polinukleotid-kinazom iz *Escherichiae-coli* zaražene bakteriofagom T4 (slika 8). Osnovna strategija metode kemijskog cijepanja je specifično cijepanje DNA označene samo jednom vrstom nukleotida. Tako se



dobiva niz radioaktivnih fragmenata čiji se članovi protežu od kraja označenog s  $^{32}\text{P}$  do jednog od položaja zauzetih izabranom bazom. Primjerice, ako se DNA koja će biti sekvencirana,  $^{32}\text{P}\text{-}5'\text{TGTAGGAGCT}3'$  cijepa na označenoj 5' strani gvaninskog ostatka, stvorit će sljedeći skup s 5'označenih fragmenata:  $^{32}\text{P}\text{-TGTAGGA}$ ,  $^{32}\text{P}\text{-TGTAG}$ ,  $^{32}\text{P}\text{-TGTA}$ ,  $^{32}\text{P}\text{-T}$ . Poliakrilamidni gel elektroforezom razdvaja ove fragmente prema veličini. Stoga se položaji gvaninskog ostatka u DNA mogu prepoznati iz relativnih položaja na gelu njihovih odgovarajućih  $^{32}\text{P}$  fragmenata označenih kao što je otkriveno autoradiografijom. Da bi ova metoda djelovala, gel mora biti dovoljne razlučivosti da se jedinstveno odvoje fragmenti koji se po duljini razlikuju od samo jednog nukleotida.<sup>12</sup>

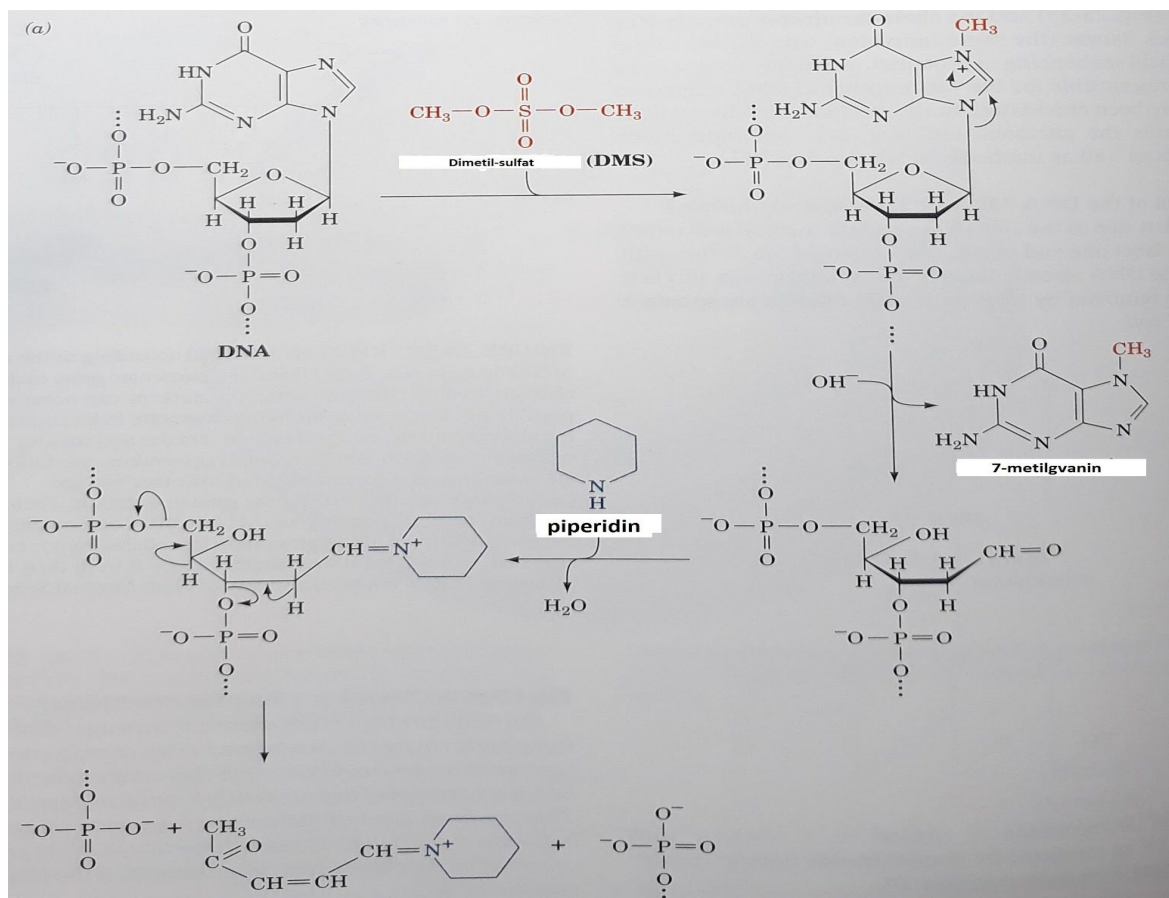
DNA koja će biti sekvencirana može se cijepati na određenim bazama, podvrgnuta u zasebnim alikvotima, s četiri različita tretmana.<sup>12</sup>

Vrste tretmana:

1. Cijepanje samo gvanina

DNA reagira s dimetil-sulfatom (DMS), koji je metilirao gvaninske ostatke na N7 položaju gvanina, stvarajući tako glikozidnu vezu metiliranog ostatka osjetljivu na hidrolizu (slika 9). Naknadna obrada piperidinom cijepa polinukleotidni lanac prije nepurinskog ostatka.

Slika 9. Prikaz reakcija koje cijepaju DNA prije gvaninskog ostatka. I adenin i gvanin ostaci se cijepaju, ako su te baze protonirane, a ne metilirane (preuzeto i prilagođeno iz ref. 12)



## 2. Cijepanje adenina i gvanina

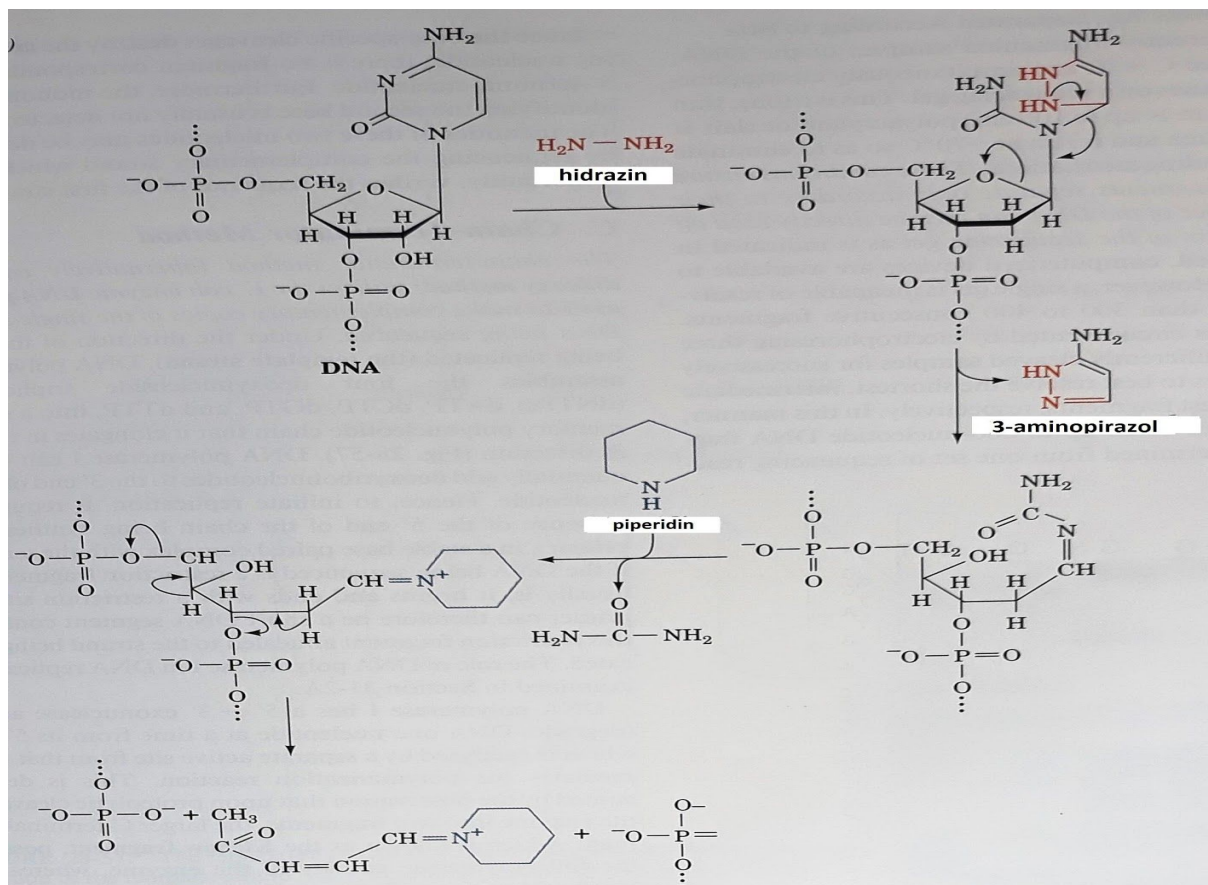
DMS preferentno metilira adeninske ostatke na N3, a ne na N7 položaju adenina, te stoga gornji tretman cijepa DNA na adeninske ostatke, na samo oko petine u odnosu na gvaninske ostatke. Ako se umjesto toga DNA obradi kiselinom, i adenin i gvanin se otpuštaju u sličnim količinama da bi se dobio isti opisani produkt na slici 9. Tretman piperidinom tada uzrokuje cijepanje prije adeninskog i gvaninskog ostatka. Ostaci adenina identificiraju se usporedbom položaja cijepanja gvanina i adenina + gvanin.

## 3. Cijepanje citozina i timina



Reakcija DNA s hidrazinom ( $\text{NH}_2\text{-NH}_2$ ), praćena piperidinskim tretmanom uzrokuje cijepanje prije citozinskog i timinskog ostatka (slika 10).

Slika 10. Prikaz reakcija koje cijepaju DNA prije citozinskog ostatka. Timinski ostaci reagiraju na sličan način, ali njihova reakcija je potisnuta u  $1\text{-}5 \text{ mol dm}^{-3}$  NaCl (preuzeto i prilagođeno iz ref. 12)

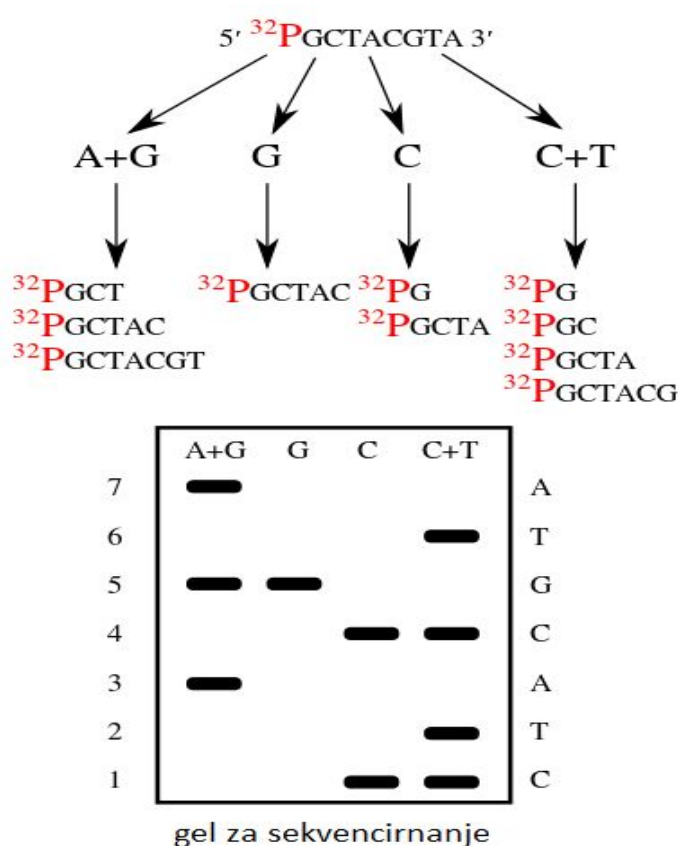


#### 4. Cijepanje samo citozina

Ako se DNA obradi s hidrazinom u  $1\text{-}5 \text{ mol dm}^{-3}$  NaCl, samo citozinski ostaci značajno reagiraju. Zatim, kao i kod purina, usporedba položaja cijepanja citozina i citozin+timin identificira timinske ostatke.<sup>12</sup>

Fragmenti nastali cijepanjem odvojeni su prema veličini. Četiri različito fragmentirana uzorka DNA, adenin + gvanin, gvanin, citozina i citozin + timin, istodobno se razdvajaju elektroforezom u paralelnim trakama na gelu za sekvenciranje. To je dugačka, tanka (svega  $0,1\text{mm}$  x do  $100\text{cm}$ ) poliakrilamidna ploča. Sadrži približno  $8 \text{ mol dm}^{-3}$  ureje i izvodi se na

70°C tako da se eliminiraju sve vodikove veze. Ovi uvjeti osiguravaju da se fragmenti DNA razdvoje samo prema veličini. Slijed DNA tada se može izravno očitati s autoradiogram gela za sekvenciranje kako je prikazano na slici 11. Na raspolaganju su bili računalni uređaji koji su pomagali u tome. Međutim, niti jedan gel nije bio sposoban razdvojiti mnogo više od 300 do 400 uzastopnih fragmenata. Ovo ograničenje zaobilazilo se elektroforezom tri niza od četiri različito cijepana uzorka za uzastopna duža vremena kako bi se najbolje razlučili kratki srednji i najduži fragmenti. Na taj se način osnovni niz od 800 nukleotidnih fragmenata DNA može odrediti iz jednog niza reakcija u slijedu.<sup>12</sup>



Slika 11. Shematski prikaz autoradiografije gela za sekvenciranje koji sadrži fragmente DNA segmenata koji je obrađen u skladu s metodom kemijskog cijepanja analize sekvenci (preuzeto i prilagođeno iz ref. 24)

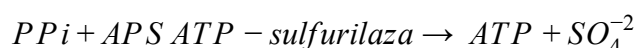
## 2.2. Metode sekvenciranja druge generacije

### 2.2.1. Pirosekvenciranje

Pirosekvenciranje je prva metoda sljedeće generacije koja se plasirala na tržište.<sup>9</sup> Pirosekvenciranje je ne-elektroforetska, bioluminiscentna metoda koja mjeri oslobađanje anorganskog pirofosfata proporcionalnim pretvaranjem u vidljivu svjetlost pomoću niza enzimskih reakcija.<sup>13</sup> U ovom slučaju, sekvenciranje se provodi sintetskim postupkom. Stoga se metodologija temelji na iterativnom ugrađivanju svakog od četiri nukleotida (dATP, dGTP, dCTP, dTTP).<sup>9</sup> Ovom metodom detektira se molekula pirofosfata koja se oslobađa tijekom ugradnje nukleotida u postojeći lanac DNA pomoću DNA-polimeraze.<sup>8,9</sup> Oslobođeni pirofosfat u drugom koraku reagira s adenozin-5'-fosfosulfatom (APS) i uz pomoć ATP-sulfurilaze tvori adenozin-trifosfat (ATP).<sup>8</sup> Mjerenje pirofosfata provodi se detekcijom emitirane svjetlosti, koja je nusprodukt transformacije luciferina u oksiluciferin, a reakciju katalizira enzim luciferaza (slika 12). Pored toga, baze koje nisu ugrađene u svaki ciklus eliminiraju se djelovanjem enzima apiraze, kako bi se izbjeglo da se ovi ostaci miješaju u kasnijim ciklusima. Svjetlost koja nastaje u reakciji, s maksimalnom valnom duljinom od 560 nanometara, detektira se CCD kamerom. Odnosno, enzimska kaskada koja se događa nakon ugradnje dNTP-ova u konačnici je odgovorna za proizvedeni bioluminiscentni signal.<sup>9</sup>

Upotreba sintetskog postupka osigurava da otkrivanje i analiza elektroforezom više nisu potrebni.<sup>7</sup>

U usporedbi s ostalim metodama nove generacije, glavna prednost pirosekvenciranja je dužina čitanja (može sekvencirati i do 800 baznih parova), a trenutno je najskuplja vrsta sekvencera nove generacije, te se koristi ukoliko je potrebna što veća duljina sekvenciranih fragmenata za npr. *de novo* sekvenciranje ili metagenomiku. Glavni nedostatak pirosekvenciranja jest loše prepoznavanje homopolimera (uzastopnih sljedova istog nukleotida). Duljina homopolimera procjenjuje se intezitetom emitirane svjetlosti.<sup>14</sup>



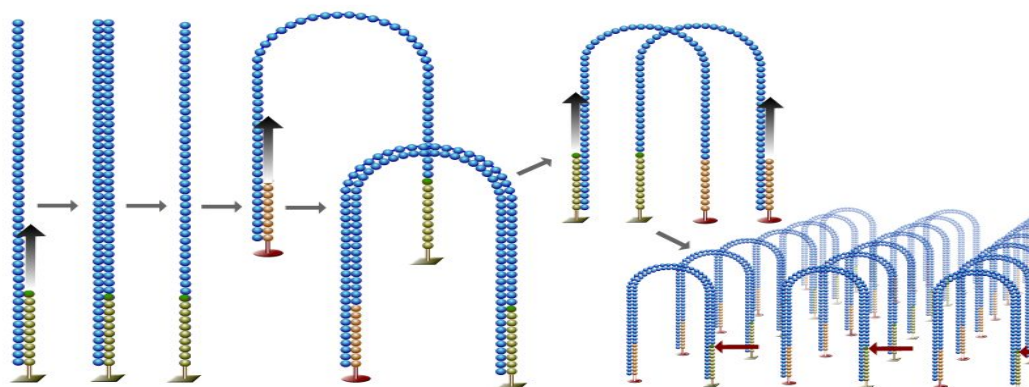
Slika 12. Glavni koraci pirosekvenciranja (preuzeto i prilagođeno iz ref. 15)

### 2.2.2. Sekvenciranje reverzibilnom terminacijom

Sekvenciranje reverzibilnom terminacijom (platforma *Illumina*) prvi su razvili *Solexa* i *Lynx Therapeutics*. Metoda se temelji na tehnici poznatoj kao „amplifikacija mosta“.<sup>11</sup> Princip rada ove metode baziran je na sekvenciranju fragmenata DNA kemijskom sintezom u kojoj se



upotrebljavaju analozi nukleotida za reverzibilnu terminaciju, te se izvodi amplifikacijom (*in vitro* umnožavanjem jedne kratke definirane DNA sekvence). O amplifikaciji govorimo kada se DNA sekvenca kopira na milijune puta. Ideja je slična onoj koja je razvijena za provođenje Sangerovog sekvenciranja, s razlikom što je u metodi reverzibilne terminacije blokada DNA polimerizacije reverzibilna, a u Sangerovom sekvenciranju je nepovratna. Sljedeća je posebnost ove tehnologije ta što se klonska amplifikacija *in vitro* zbog umnožavanja broja molekula koje treba sekvencirati provodi pomoću PCR-a (eng. polymerase chain reaction; lančana reakcija polimeraze). U ovoj se metodi fragmenti spajaju s početnicama imobiliziranim na čvrstoj površini, provodeći amplifikaciju *in situ*, generirajući nakupine DNA s identičnim molekulama (klasteri) (slika 13).<sup>9</sup> Nastali klasteri mogu sadržavati oko tisuću amplicona, a nekoliko milijuna klastera može se nalaziti i razlikovati od ostalih na svakoj odijeljenoj stazi na pločici. Nakon generiranja klastera, ampliconi su jednolančani i hibridizirani s početnicom.<sup>14</sup>



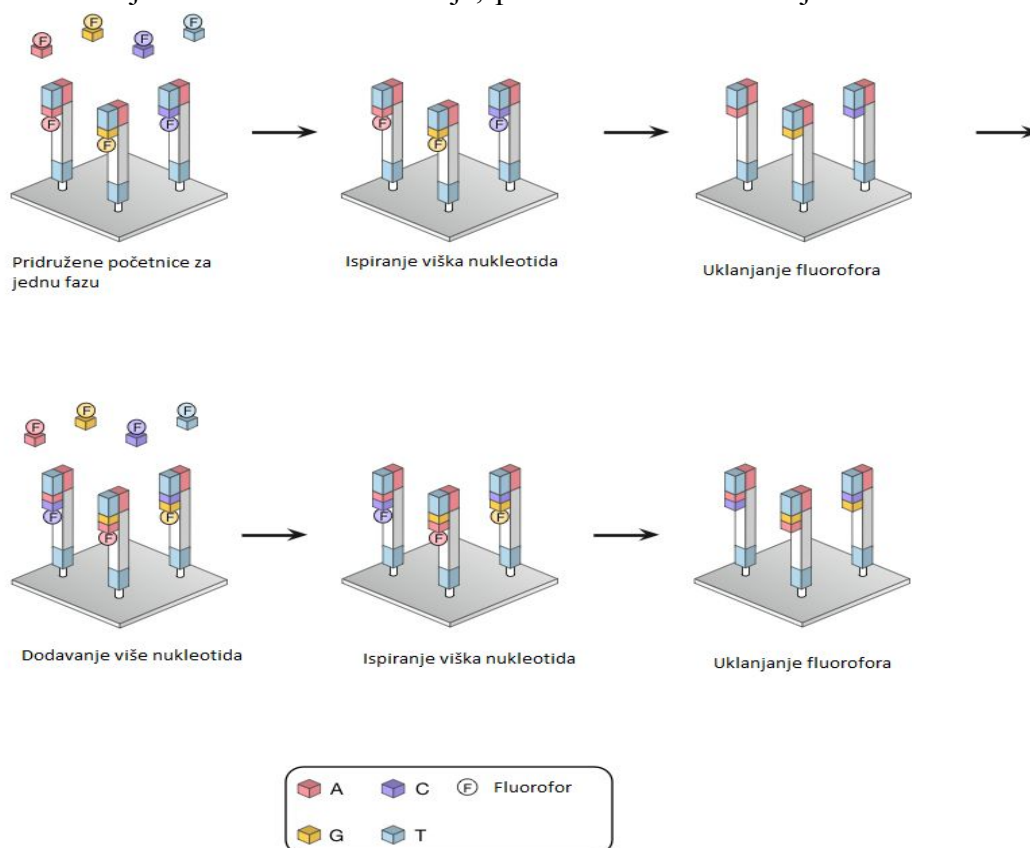
Slika 13. Sekvenciranje reverzibilnom terminacijom. Fragmenti su pričvršćeni na početnice imobilizirane na čvrstoj površini, izvodeći amplifikaciju mosta i stvarajući nakupine DNA s identičnim molekulama (preuzeto i prilagođeno iz ref. 16)

U svakom su ciklusu četiri reverzibilna terminacijska nukleotida istovremeno dodani i ugrađeni pomoću polimeraze. Ti su nukleotidi kemijski blokirani zamjenom 3'-OH skupine u 3'-O $\theta$ -azidometil skupinu, kako bi se spriječilo da polimeraza uključi više nukleotida u pojedinom ciklusu. Nakon ugradnje nukleotida, emitira se fluorescentni signal koji se mjeri

totalnom unutarnjom refleksnom fluorescencijom (eng. total internal reflection fluorescence; TIRF), pomoću različitih laserskih kanala. Što se tiče sljedećeg ciklusa, nukleotidi koji nisu ugrađeni su isprani i kemijska blokada 3'- kraja uklonjena je upotrebom tris-(2-karboksietil)-fosfina, kako bi se nastavila sinteza lanca. Jednom kada se prikupi fluorescentni signal, započinje novi ciklus koji ponavlja ovu dinamiku sve dok se sekvenciranje svakog fragmenta ne završi. Ukratko, mogli bismo reći da se reakcija sekvenciranja provodi u tri koraka: dodavanjem nukleotida, slikanjem i regeneracijom 3'-OH skupine cijepanjem fluoroforom (slika 14).<sup>9</sup>

Slika 14. Prikaz jednog ciklusa rada metode reverzibilne terminacije (preuzeto i prilagođeno iz ref. 17)

Kao što je iznad naznačeno, sustav detekcije koji se koristi za metodu reverzibilne terminacije je totalna unutarnja refleksna fluorescencija, poznata i kao kratkotrajna valna mikroskopija.



Njegova glavna prednost u odnosu na ostale sustave je ta što je u stanju detektirati fluorescenciju molekula koje su vrlo blizu čvrste površine (staklene ili plastične) i vrlo je selektivan. Pomoću TIRF-a moguće je osvijetliti vrlo tanki sloj dubine manje od 100 nm,

izbjegavajući pobuđivanje drugih fluorofora koji su u blizini, a čija emisija nije potrebna za mjerenje.<sup>9</sup>

Trenutno se sekvenciranje reverzibilnom terminacijom koristi u brojim projektima u kojima je potrebno sekvencirati veliku količinu DNA. To nije samo zbog njihove visoke preciznosti u sekvenciranju i niskih troškova, već i zbog toga što imaju na raspolaganju veliku opremu na tržištu koja se može prilagoditi potrebama svakog projekta. To se kreće od malih uređaja sa srednjim performansama, kao što je MiniSeq, do mega opreme koja se koristi za sekvenciranje projekata čitavih genoma u populaciji, poput HiSeqX-a.<sup>9</sup>

### 2.3. Metode sekveniranja treće generacije

#### 2.3.1. Sekvenciranje pojedinačnih molekula u stvarnom vremenu

Prvi pristup, monomolekularnom sekvenciranju u stvarnom vremenu (SMRT sekvenciranje) razvili su Craighead, Korlach, Turner i Weber, a zatim su ga usavršili i komercijalizirali *Pacific Biosciences (PacBio)* od 2011. godine.<sup>6</sup> *PacBio* je komercijalizirao dva slijeda sustava, izvorni RSII model (slika 15.) i odnedavno, SequelTM. Omogućava sekvenciranje vrlo dugih fragmenata, od 30-50 kilobaza ili duže. SMRT metoda uključuje vezanje DNA polimeraze sa vezanom DNA koja će biti sekvencirana, na dno jažice (u protočnoj ćeliji SMRT).<sup>11</sup> Koristi se tehnologijom „vodiča vala u nultom-modu“ (eng. zero-mode waveguide, ZMW).<sup>8</sup> ZMW je mala komora koja usmjerava svjetlosnu energiju u područje čije su dimenzije malene u odnosu na valnu duljinu svjetlosti. Zbog korištenja ZMW dizajna i valne duljine svjetlosti, snimanje nastaje samo na dnu ZMW-a gdje DNA polimeraza, vezana na DNA, uključuje svaku bazu u rastući lanac. Četiri nukleotida označeni su različitim fluoroforima za detekciju. Kada se nukleotid ugradi u rastući lanac, slika se pojavljuje u milisekundi kao ispravan fluorescentno obilježeni nukleotid. Nakon ugradnje oslobađa se fosfatni fluorescentni dio koji „odlazi“ s dna ZMW-a i više se ne može detektirati. Zatim se može ugraditi sljedeći nukleotid.. Slika je tempirana brzinom ugradnje nukleotida tako da je svaka baza identificirana onako kako je ugrađena u rastući lanac DNA. To se istovremeno događa, paralelno, u do milijun zeptolitara ZMW-a, prisutnih na jednom čipu unutar SMRT ćelija. Priprema predložka jedinstvena je u SMRT sekvenciranju, jer uključuje proizvodnju „SMRTbell“, kružne dvolančane molekule DNA s poznatim adapterskim nizom

komplementarnih početnica koje se koriste za pokretanje sinteze DNA. To omogućava polimerazi da čita predložak, odnosno početnice, mnogo puta prelazeći kružnom molekulom u svakom ZMW-u, sve dok se polimeraza ne zaustavi, da bi se stvorio konsenzusni niz (kružni konsenzusni slijed). Kako adapteri vezani na svaku stranu umetka imaju mjesta za početak DNA sinteze, sekvencijalna polimeraza može prijeći kružni SMRTbell u 5'- 3' smjeru na bilo kojem DNA lancu, pružajući komplementarne informacije s oba lanca dsSMRTbell. Važna prednost SMRT sekvenciranja je detekcija u stvarnom vremenu i to što se brzina dodavanja svakog nukleotida tijekom sinteze može izmjeriti, a naziva se trajanjem interpulsa (eng. interpulse duration; IPD). Mnogi (ali ne svi) nukleotidi s modifikacijama baza, poput nekih metilacija adenina i citozina, mijenjaju IPD i tako se mogu identificirati kao modificirane baze.<sup>11</sup>

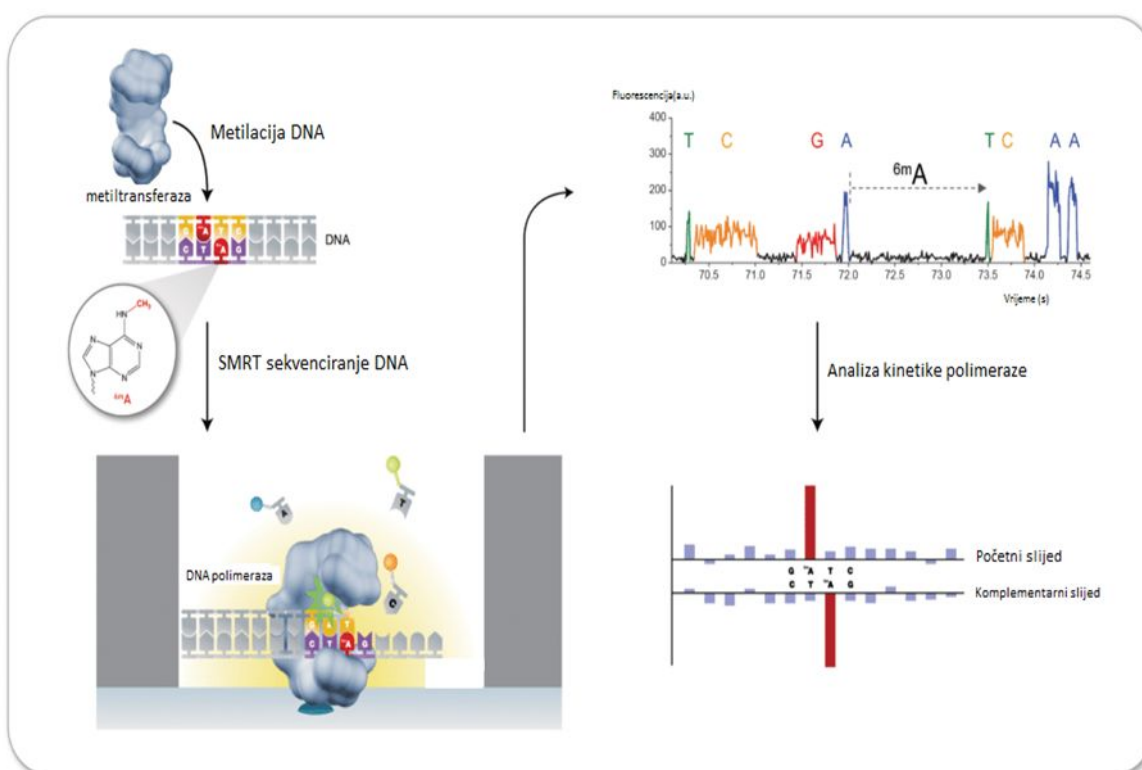


Slika 15.  
RSII  
preuzeto

*PacBio*  
uređaj (  
i

prilagođeno iz ref. 19)

SMRT sekvenciranje nudi nekoliko prednosti u odnosu na prethodne metode. Omogućuje brzu identifikaciju mjesta metilacije za epigenetičke studije, uz omogućavanje dugog čitanja sklopa genoma. Npr., koristeći *PacBio* tehnologiju, relativno je jednostavno sastaviti cjelovitu sekvencu bakterijskog genoma koristeći samo nekoliko SMRT stanica i odrediti modifikacije baza (npr. metilacije). *PacBio* sklopovi često se kombiniraju s drugim metodama, poput sekvenciranja reverzibilnom terminacijom, radi veće preciznosti. U pogledu propusnosti, *PacBio* RSII (2013) koristi čipove sa 150 000 ZMW-a koji, kada su optimizirani, mogu generirati čak 350 megabaza (mb) sekvenca po SMRT ćeliji. Najnoviji *PacBio* instrument, Sequel, ima milijun ZMW-a i može stvoriti 365 000 čitanja, s prosječnim očitanjem od 10-15 kilobaza (kb) (7,6 gigabaza izlaza).<sup>11</sup>

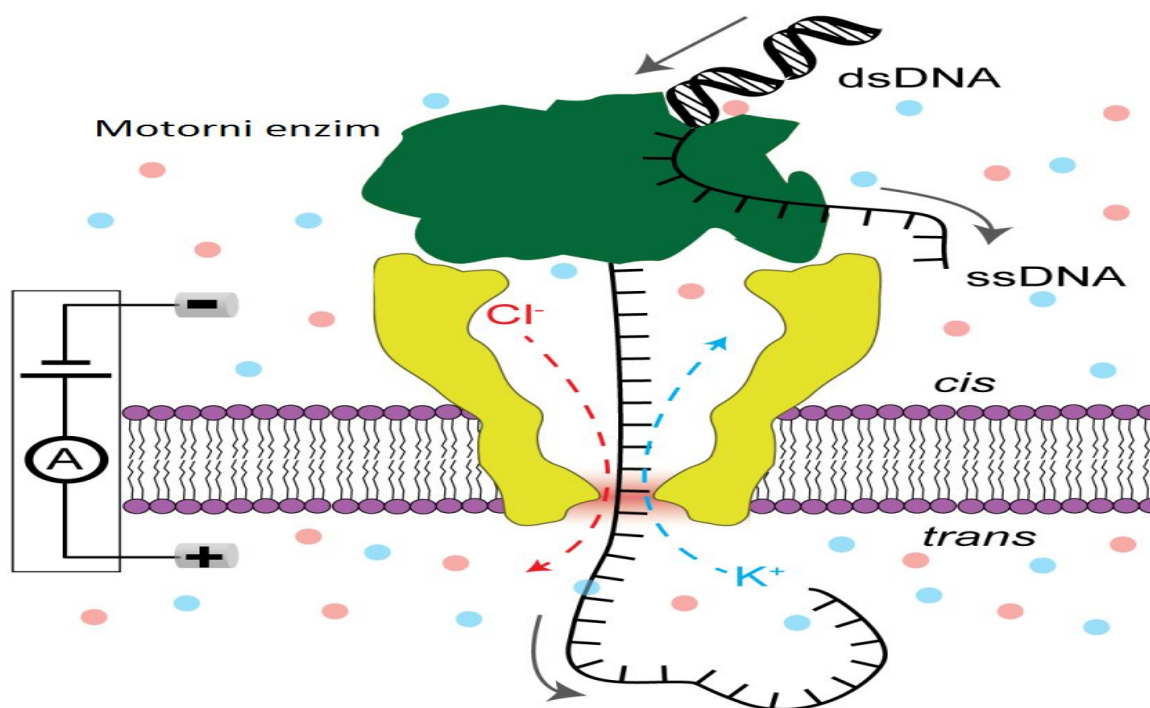


Slika 16. Shematski prikaz postupka procesa SMRT sekvenciranja DNA (preuzeto i prilagođeno iz ref. 18)

### 2.3.2. Sekvenciranje pomoću nanopora

Druga platforma koja koristi sekvenciranje DNA u stvarnom vremenu je platforma *Oxford Nanopore*. Ova tehnika koristi nanosenzore koji tvore strukturu kanala i koji omogućavaju

otkrivanje svakog nuklotidnog ostatka prisutnog u DNA lancu. Temelji se na translokaciji kroz pore u membrani koja odvaja zasebne komore.<sup>9</sup> Koriste se dvije vrste sustava nanopora za sekvenciranje DNA, biološki membranski sustavi i tehnologija čvrstog stanja. Biološke nanopore upotrebljavaju transmembranske proteine ugrađene u lipidnu membranu za stvaranje pora. Dva proteina koja su korištena za stvaranje pora detaljno su proučavana: alfa hemolizin i porin A iz bakterije *Mycobacterium smegmatis* (MspaA). Brzina prolaska DNA kroz pore regulirana je dodatkom motornih proteina, poput visoko procesivne DNA polimeraze (phi29). Ostali dodatni proteini, kao što je DNA helikaza, egzonukleaza I ili oligonukleotidi koji povezuju DNA lance, omogućuju odmotavanje i prolazak DNA nukleotida kroz nanopore (slika 17). Duge dvolančane molekule DNA (ds DNA) najprije se vežu na procesivni enzim, kao što je phi29 polimeraza. Kada kompleks dođe do nanopora, jedan lanac DNA ulazi u nanopore i brzina translokacije kroz pore regulira se sintezom i translokacijom DNA polimeraze.<sup>11</sup> Načelo detekcije sustava oslanja se na razlici potencijala, koji nastaje kada nabijena molekula, kao što je molekula DNA, prođe kroz nanopore u membrani. Membrana razdvaja dvije komore, koje su napunjene provodljivim elektrolitom. Napon se koristi za pokretanje lanaca DNA kroz pore, što rezultira promjenom potencijala.<sup>7</sup> Svaki nukleotid daje karakterističan električni signal koji je zabilježen kao trenutna promjena potencijala.<sup>11</sup> Promjene primijećene u izmjenom naponu nisu samo posljedica potencijalne promjene nastale prolaskom fragmenta DNA, već i njezinog trajanja. Ovi pomaci napona karakteristični su za svaki slijed DNA. Stoga, umjesto da koristi sekundarni signal poput svjetlosti, boje ili pH za otkrivanje očitane DNA, nanopore platforma izravno detektira sastav DNA-predložka.<sup>9</sup> Transport jednolančane (ssDNA) DNA kroz pore može doseći brzinu od oko 1 nukleotida po mikrosekundi.<sup>7</sup> Nakon što DNA napusti nanopore, pore su dostupne za sekvenciranje druge molekule DNA. Snimanje se vrši u stvarnom vremenu, a trenutna čitanja su do 10 kilobaza DNA (u teoriji se može dostići čitanje i do 100 kilobaza DNA).<sup>11</sup> S obzirom na činjenicu da ova tehnologija koristi nemodificiranu DNA, ona daje prednost vrlo brzog dobivanja rezultata od minimalnih početnih količina.<sup>9</sup>



Slika 17. Shematski prikaz sekvenciranja DNA pomoću nanopora. Slika prikazuje kako motorni enzim kontrolira translokaciju jednolančane DNK kroz MspA. (preuzeto i prilagođeno iz ref. 20)

MinION je sustav nanopora koji je *Oxford Nanopore Technologies* učinio komercijalno dostupnim 2014. godine. Ovaj uređaj teži samo 100 grama i može se povezati s računalom putem USB-a (slika 18).<sup>7</sup> MinION je privukao puno pažnje zbog male veličine i jednostavnosti. Još jedna prednost je ta što ne određuje slijed DNA pomoću sekundarnih signala poput svjetlosti ili koncentraciji  $H^+$  iona, već to čini izravno i u stvarnom vremenu.<sup>9</sup> Također može identificirati modifikacije baza, omogućujući lako prepoznavanje epigenetskih događaja, te nudi izravno sekvenciranje RNA.<sup>11</sup> U budućnosti će biti potrebno kombinirati najbolje aspekte svake platforme da bismo dobili sekvenciranje koje nudi kompletne sekvence genoma, brzo, jeftino i jednostavno. Tada će pojmovi poput personalizirane dijagnoze, genomske medicine ili potpuno individualizirani medicinski tretmani postati stvarnost.<sup>9</sup>





Slika 18. Oxford Nanopore Technologies uređaji (preuzeto i prilagođeno iz ref. 21)

Osim MinION-a, postoje sustavi veće propusnosti i kapaciteta GridION X5 i PromethION (slika 18.).<sup>25</sup> GridION X5 uglavnom zbog svojih troškova, manje je raširen, ali vrlo pogodan za istraživače s velikim projektima sekvenciranja. Drastično povećava učinak jednog MinION eksperimenta na više od 100 gigabaza podataka DNA sekvence tijekom 48 sati izvođenja sekvenciranja, što ovaj instrument čini pogodnim za istraživače sa širim projektima.<sup>26</sup> Nanopore očitavaju duljinu DNA ili RNA  $> 2$  megabaze (Mb). Kompaktni stolni uređaj s integriranim računalom pogodan je za bilo koji laboratorij. Veličine: širina 370 mm, visina 220 mm, duljina 365 mm, a težine 11 kilograma. Najčešće se primjenjuje u istraživanjima velikih genoma, te cijelih transkripata (izravna RNA ili cDNA). Pogodan je za korištenje velikog broja uzoraka. Uređaj ima mogućnost pokretanja više eksperimenata odjednom i potrebna mu je minimalna informatička infrastruktura.<sup>27</sup>

Nadalje, PromethION uređaj je dostupan u dva modela: PromethION 24 (P24) i PromethION 48 (P48), koji mogu istodobno raditi s 24 i 48 protočnih stanica. Nanopore očitavaju duljinu DNA ili RNA  $> 2$  megabaze. Svaka protočna stanica ima približno šest puta veći kapacitet sekvenciranja od protočne stanice MinION-a. Doprinos do 180 gigabaza po protočnoj stanici. Veličina : širina 178 mm, visina 440 mm, duljina 470 mm, a teži 25 kilograma. Izvodi višestruke DNA ili RNA eksperimente odjednom. Najčešće se primjenjuje za istraživanja



velikih genoma, sekvenciranja na razini stanovništva, cijelih stranskripata (izravna RNA ili cDNA), te za visoko multipleksirane male genome ili ciljane regije.

Osim MinION-a, PromethION-a i GridION-a, možemo još spomenuti uređaje poput Flongle, VolTRAX, te SmidgION-a (slika 18).

Flongle i VolTRAX su izrazito male veličine i težine (20-300 grama). Vrlo su jednostavni i pogodni za manje testove.

SmidgION je osmišljen kako bi omogućio analize većem broju ljudi i na više lokacija. Sličan je MinION-u i PromethION-u, ali uparuje se s pametnim telefonima ili drugim mobilnim uređajima male snage. Dizajniran je za široku paletu terenskih analiza; potencijalne primjene mogu uključivati daljinsko praćenje patogena u slučaju izbijanja ili zarazne bolesti, analiza uzoraka okoliša na licu mjesta kao što su uzorci vode, analizu hrane, drveta, divljih životinja ili čak nepoznatih uzoraka u stvarnom vremenu, terenska analiza poljoprivrednih okoliša i još mnogo toga.<sup>27</sup>

## 2.4. Sekvenciranje genoma

Genom je potpuna genetska informacija organizma ili stanice. Jednolančane ili dvolančane nukleinske kiseline pohranjuju ove podatke u linearnom ili kružnom obliku. Da bi se ta sekvenca precizno odredila, razvijene su progresivno učinkovite tehnologije karakterizirane povećanom preciznošću, propusnošću i brzinom sekvenciranja. Unatoč tome višestruke kopije DNA cjelokupnog genoma razdvajaju na male fragmente, koji su sekvencirani, a zatim su te sekvence nazvane "čitanja" (eng. *reads*), koje se razlikuju samo u definiranim rasponima duljina, obično daleko kraćim od veličine ispitivanih genoma. Kompletna sekvenca genoma mora se rekonstruirati iz preklapanja kraćih fragmenata, postupkom definiranim kao *de novo* sklapanje genoma. Povijesno, uglavnom zbog vremenskih i troškovnih ograničenja, obrađena je samo jedinka po vrsti, a njihov niz uglavnom predstavlja referentni genom za tu vrstu. Referentni genomi mogu se primijeniti za razumijevanje funkcije gena ili se mogu koristiti za genetičku manipulaciju. Sekvence različitih vrsta mogu se usporediti radi proučavanja molekularne evolucije (tablica 1).<sup>6</sup>

Tablica 1. Kronologija napretka u sastavljanju genoma. Pojedini genom ili projekt genoma obojen je drugom bojom, ovisno o prihvaćenom pristupu sekvenciranja. Crveno: metode ranog sekvenciranja, narančasto: određivanje terminacijskim metodama, zeleno: metode druge generacije, plavo: metode treće generacije. Preuzeto i prerađeno prema ref. 6

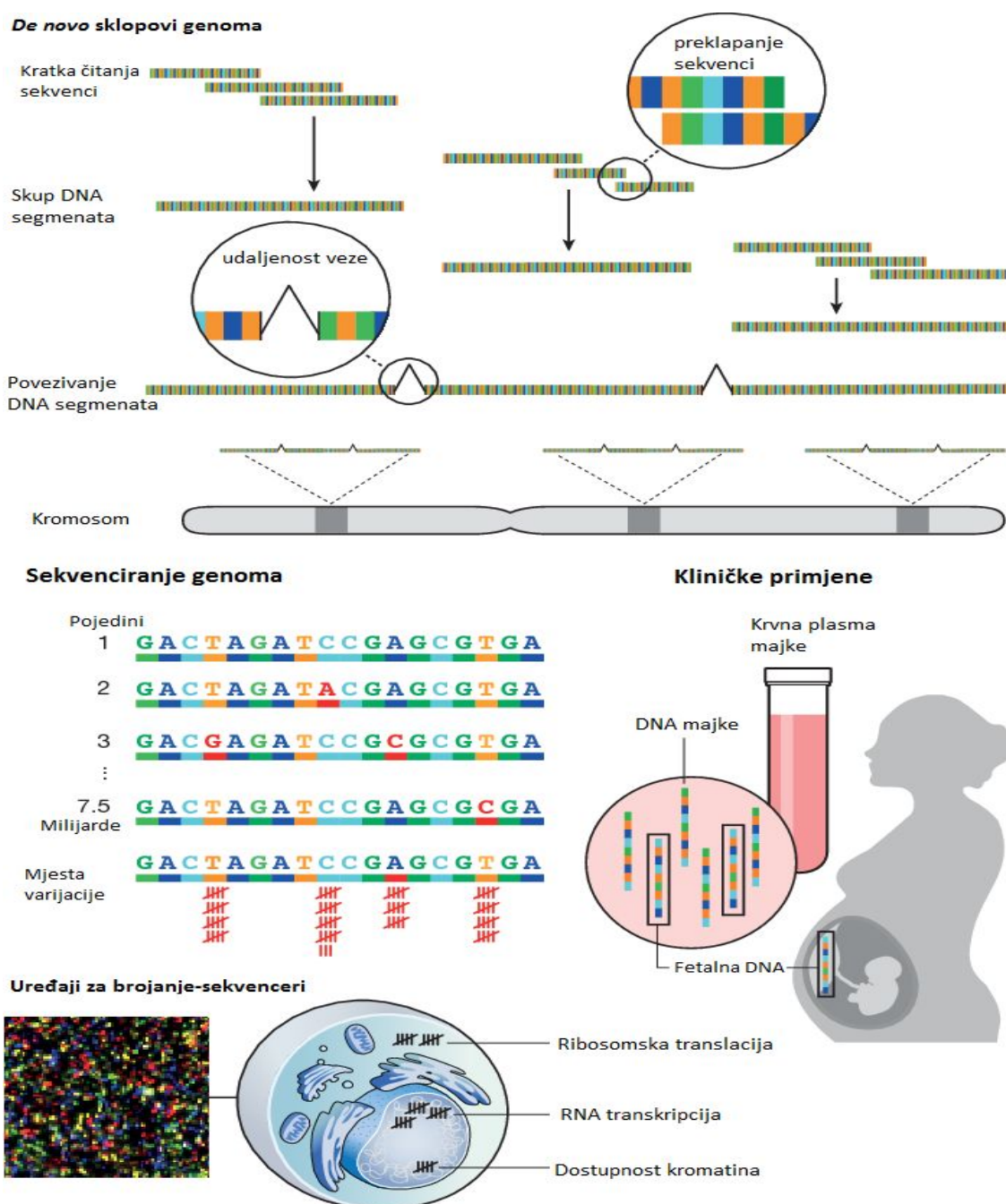
Godina	Vrsta	Broj baznih parova*
1965.-1970.	Kvasac	Djelomična tRNA, 76 bp
	<i>Escherichia coli</i>	5S RNA, 120 bp
1970.-1975.	Bakteriofag MS2	RNA, 3569 bp
1975.-1980.	Bakteriofag <i>phi X174</i>	5,4 kbp*
1980.-1985.	Bakteriofag <i>lambda</i>	48 kbp
	<i>Epstein-Barr virus</i>	172 kbp
1990.-1995.	<i>Vaccinia virus</i> (kravlje boginje)	192 kbp
	Humani citomegalovirus	229 kbp
1995.-2000.	<i>Mycoplasma genitalium</i>	0,58 Mbp*
	Ljudska gripa	1,8 Mbp
	Kvasac	12 Mbp
	<i>Escherichia coli</i>	4,6 Mbp
	<i>Caenorhabditis elegans</i>	97 Mbp
	<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>	166 Mbp
2000.-2005.	<i>Arabidopsis</i>	115 Mbp
	Voćna mušica	120 Mbp
	Komarac-prijenosnik malarije	270 Mbp
	Pas	2,3 Gbp*
	Miš	2,66 Gbp
	Štakor	2,75 Gbp
2005.-2010.	<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	16,5 Mbp
	Riža	389 Mbp
	Čimpanza	3,23 Gbp
	Kukuruz	2,3 Gbp
	Projekt 10 000 genoma kralježnjaka ( 66 000 vrsta)	
	Projekt 1 000 genoma ljudske genetske varijacije	
2010.-2015.	Riba zebrica	1,4 Gbp
2015.-2020.	Neandertalac, Denisovan	
	<i>All of Us</i>	
	Afrička kandžasta žaba	3,1 Gbp
	Razno bilje ( <i>10 000 Plants</i> )	
	Krava	3 Gbp
	Aksoloti	32 Gbp

\*bp - Bazni par = je jedinica koja se sastoji od dvije nukleobaze povezane međusobno vodikovim vezama.  
 kb (kbp) = kilo baznih parova = 1 000 bp  
 Mb (Mbp) = mega bazni parovi = 1 000 000 bp  
 Gb (Gbp) = giga bazni parovi = 1 000 000 000 bp

Prvih 25 godina glavna namjena sekvenciranja DNA bila je djelomično ili potpuno sekvenciranje genoma. Početak Sanger-ovog sekvenciranja 1970. godine obuhvatio je prvi genom ( $\phi$ X174; 5,4 kb), u osnovi sastavljen ručno. Sklapanje genoma je ponovna izgradnja izvorne DNA sekvence iz kraćih sljedova dobivenih sekvenciranjem. Ako bi DNA sljed bio slučajan, proizvoljno veliki genomi mogu se sastaviti do kraja isključivo na temelju fragmentarnih preklapanja. To nije slučajno, a kombinacija ponavljajućih sekvenci i slaba tehnička potpora (manjak metoda za sekvenciranje cijelog genoma) onemogućava dobivanje visokokvalitetnih velikih cjelovitih genoma samo iz čitanja u kb (kilobazama). Potrebne su dodatne „informacije o neprekidnosti“. Za HGP (Human Genome Project) su dodatni podaci o neprekidnosti uključivali sljedeće: Genetske mape, fizičke mape i sekvence s uparenim krajem, koje je Ansorge uveo 1990. godine, uključuju sekvence na oba kraja DNA fragmenta otprilike poznate duljine, učinkovito povezujući te krajnje sekvence. Ovisno o metodi kloniranja, raspon duljina može se kretati od nekoliko kilobaza do nekoliko stotina kilobaza. Pomoću ovih metoda omogućilo se ne samo sastavljanje genoma, već je i poboljšana kvaliteta u do oko jedne pogreške na 100 000 baza za većinu genoma. Za popunjavanje praznina i za razrješavanje nejasnoća izvedeni su dodatni ciljani eksperimenti. Nakon Ansorgea, *Celera* je zaobišao fizičke mape kao intermedijere, a važan napredak bio je prijelaz na pristup koji se temeljio na grafovima *Celera* (preklapanje-poravnanje-konsenzus). Iako je *Celera* imao razumnu strategiju za nacrt genoma, zbog slojevitosti ponavljajućih sekvenci, sam po sebi nije rezultirao kvalitetnim rješenjem, poput onog proizvedenog HGP-ovim kloniranim pristupom. Trenutni ljudski referentni genom potječe od HGP-a iz 2004. godine, te je na daljnjem poboljšanju kontinuiranim radom *Genome Reference Consortium-a*. Sa pojavom NGS-a 2005. godine, broj *de novo* sklopljenih genoma znatno se povećao. Naizgled katastrofalna kombinacija kratkih čitanja i ponavljanih genoma prevladana je novim algoritmima za sklapanje genoma temeljenim na de Bruijnovim grafovima (na primjer, EULER i Velvet). Ipak, posebno kada se primjenjuju na veće genome i u usporedbi sa genima HGP-a, njihova je kvaliteta u prosjeku bila prilično loša. Iako su djelomično krive kratke dužine čitanja, umjesto toga, glavni razlog lošije kvalitete bio je nedostatak metoda koje nadopunjuju NGS. Bez obzira na ovo „mračno“ razdoblje, postoje dobri razlozi da budemo optimistični u pogledu budućnosti *de novo* sklapanju genoma. Nedavno su razvijene *in vitro* metode koje uključuju uzorke genomskih fragmenata visoke molekulske mase (HMW, eng. *high molecular weight*). Zatim, metode kao što su Hi-C (snimanje kromosomske

konformacije u čitavom genomu) i optičko mapiranje pružaju skalabilne, isplative načine slaganja genoma u sklopove, pa sve do kromosomske razine. Konačno, očitana duljina SMRT i sekvenciranja pomoću nanopora porasla je na stotinu kilobaza. Odsutnost koraka kloniranja ili amplifikacije u sekvenciranju jedne molekule isplati se, što pokazuju visokokvalitetni *de novo* sklopljeni bakterijski genom sekvencirani pomoću platforme *PacBio*. Duga čitanja rezultirala su ponovnom pojavom strategija koje koriste alate *Celera*, poboljšanih za rješavanje visokih stopa pogreške. Kombinacija dugih čitanja i informacija s većim rasponom podataka (na primjer, poduzorkovanje HMW DNA, blizina kromatina, optičke karte i sl.), te kvaliteta *de novo* sklopova genoma izvornog ljudskog referentnog genoma, primjenom „post-Sanger“ pristupa, konačno je vidljiva.<sup>5</sup> Evolucija ljudskog referentnog genoma ukratko je opisana u tablici 2.

Postoje područja u kojima se sekvenciranje DNA već pokazuje korisnim, a to je klinička medicina. Najneočekivanije područje kliničkog utjecaja sekvenciranja DNA je bio neinvazivno prenatalno testiranje (slika 19). Studije Lo i Quake u 2008. godini pokazali su da jednostavno prebrojavanje fragmenata DNA koje je u majčinu cirkulaciju izbacio fetus tijekom trudnoće može otkriti kromosomske aneuploidije. Screening-testovi koji se temelje na ovoj strategiji usvojeni su brže od bilo kojeg molekularnog testa u povijesti. Rana primjena sekvenciranja cijelog genoma (WGS-a, eng. *Whole Genome Sequencing*) bila je za brzo otkrivanje novih gena i dijagnosticiranje bolesnika zahvaćenih Mendelovim poremećajima. WGS se također koristi za naše razumijevanje raka, u osnovi bolesti genoma, a postepeno se transformira DNA sekvenciranjem.<sup>5</sup>



Slika 19. Primjene sekvenciranja DNA. Slika prikazuje glavne kategorije primjene sekvenciranja DNA koje uključuju *de novo* sklapanje genoma, individualno rekvencioniranje genoma, kliničke primjene kao što je neinvazivno prenatalno testiranje i korištenje sekvencera kao uređaja za brojanje širokog spektra biokemijskih ili molekularnih pojava (preuzeto i prilagođeno iz ref. 5).

Tablica 2. Tehnološka vremenska crta: Evolucija projekta ljudskog genoma. Preuzeto i prerađeno prema ref. 1

Godina	Događaj
1985-1988	Ideja za sekvenciranje ljudskog genoma predlaže se na nekoliko znanstvenih skupova.
1988	Kongres ovlašćuje Ministarstvo Energetike i Nacionalne Zdravstvene Zavode da financiraju projekt ljudskog genoma.
1989	Istraživači sa sveučilišta Stanford i Duke izumili su tehnologiju DNA-čipova.
1990	Službeno proglašenje početka projekta ljudskog genoma.
1991	Razvoj tehnologije koja identificira sekvence koje kodiraju proteine.
1992	Dostupni su prvi DNA-čipovi.
1993	Prepoznata je potreba za automatizacijom sekvenciranja DNA.
1994	Američki i Francuski istraživači objavljuju preliminarnu mapu od 6000 genetskih markera, jednu na svakih 1 milijun baza duž kromosoma
1995	Naglasak se pomiče s mapiranja genoma na sekvenciranje.
1996	Donesena je odluka na drugom međunarodnom strateškom sastanku o sekvenciranju ljudsko genoma kako bi se svi podaci učinili javnim i svakodnevno se ažurirali u GenBank-u.
1998	Javni konzorcij objavio je preliminarnu mapu dijelova koji pokrivaju 98 posto ljudskog genoma. Milijuni sekvenci navedeni su u GenBank-u. Upute za razvijanje DNA mikromreža objavljene su na internetu.
1999	Utrostručena stopa pohrane novih sekvenci u GenBank.
2000	29 posto ljudskog genoma sekvencirano je u privatne svrhe.
2001	Dvije verzije slijeda ljudskog genoma objavljene su sredinom veljače u časopisima <i>Science</i> i <i>Nature</i> .
2003	Najavljena je gotova verzija sekvence ljudskog genoma i poklapa s pedesetom godišnjicom otkrića strukture DNA. Čitav dio ljudskog genoma koji kodira proteine postaje dostupan na DNA-čipovima. Američki Nacionalni institut za istraživanje ljudskog genoma objavio je "Viziju budućnosti istraživanja genomike."
2004 i dalje	Nastavlja se anotacija ljudskog genoma (smještaj i opisivanje funkcionalnih elemenata unutar genoma), početni referentni ljudski genom se sve više utočnjava i upotpunjuje, sekvencira se sve veći broj individualnih ljudskih genoma radi populacijskih i primijenjenih istraživanja. Genomika utječe i primjenjuje se u zdravstvenoj zaštiti.

## § 3. LITERATURNI IZVORI

1. R. Lewis, *Human Genetics, Concepts and Applications*, Sixth Edition, McGraw-Hill, New York, 2005. str. 420-430.
2. R. Lewis, *Human Genetics, Concepts and Applications*, Third Edition, McGraw-Hill, New York, 1999. str. 141-143.
3. <https://edutorij.e-skole.hr/share/proxy/alfresco-noauth/edutorij/api/proxy-guest/3b8a4b4e-84b0-4580-aa6f-e38efe028ed9/biologija-8/m01/j05/index.html> (datum pristupa 10. kolovoza 2020.)
4. R. J. Brooker, *Genetics, Analysis & Principles*, Second Edition, USA, str. 510-520.
5. J. Shendure, S. Balasubramanian, G. M. Church, W. Gilbert, J. Rogers, J. A. Schloss, R. H. Waterston, *DNA sequencing at 40: past, present and future*, *Nature* **550** (2017) 345-353.
6. A.M. Giani, G. R. Gallo, L. Gianfranceschi, G. Formenti, *Long walk to genomics: History and current approaches to genome sequencing and assembly*, *Comput.*

- Struct. Biotechnol. J. **8** (2020) 9-19.
7. B.B. Bruijns , R. M. Tiggelaar, J. G. E. Gardeniers, *Massively parallel sequencing techniques for forensics*, Electrophoresis **39** (2018) 2642-2654.
  8. R. Trupković, *Nove metode sekvenciranja DNA*, Završni rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, 2018, str. 1.
  9. J. A. Garrido-Cardenas, F. Garcia-Maroto, J. A. Alvarez-Bermejo, F. Manzano-Agugliaro, *DNA Sequencing Sensors: An Overview*, Sensors **17** (2017) 558.
  10. <https://www.onlinebiologynotes.com/sangers-method-gene-sequencing/> (datum pristupa 24.travnja 2020.)
  11. B. E. Slatko, A. F. Gardner, F. M. Ausubel, *Overview of Next-Generation Sequencing Technologies*, Curr. Protoc. Mol. Biol. **122** (2018) e59.
  12. D. Voet, J. G. Voet, *Biochemistry*, second edition, New York, str. 888-895.



13. M. L. Metzker, *Sequencing technologies: the next generation*, Nature **11** (2010) 31-46.
14. D. Vučenović, *Sekvenciranje nove generacije*, Seminarski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2013, str. 5.
15. <https://genome.cshlp.org/content/11/1/3/F1.expansion.html> (datum pristupa 25. travnja 2020.)
16. [https://en.wikipedia.org/wiki/File:DNA\\_Sequencing\\_Bridge\\_Amplification.png](https://en.wikipedia.org/wiki/File:DNA_Sequencing_Bridge_Amplification.png) (datum pristupa 27. travnja 2020.)
17. <https://www.atdbio.com/content/58/Next-generation-sequencing> (datum pristupa 27. travnja 2020.)
18. <https://www.pacb.com/base-modification-detection-spotlight-dna-base-modification/> (datum pristupa 19. lipnja 2020.)
19. <https://www.pacb.com/products-and-services/attachment/pacbio-system-pacbio-rs-ii-machine/> (datum pristupa 19. lipnja 2020.)
20. <https://journals.plos.org/plosone/article/figure?id=10.1371/journal.pone.0181599.g001> (datum pristupa 8. srpnja 2020.)
21. <https://www.foodnavigator.com/Article/2018/03/21/Oxford-Nanopore-r>

- [aises-funds-to-support-commercial-expansion](#) (datum pristupa 1. rujna 2020.)
22. <http://www.vce.bioninja.com.au/aos-3-heredity/molecular-biology-technique/sequencing.html> (datum pristupa 1. rujna 2020.)
23. <https://www.sciencelearn.org.nz/resources/527-how-to-add-foreign-dna-to-bacteria> (datum pristupa 1. rujna 2020.)
24. [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Maxam-Gilbert\\_sequencing\\_en.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Maxam-Gilbert_sequencing_en.svg) (datum pristupa 1. rujna 2020.)
25. R. M. Leggett, M. D. Clark, *A world of opportunities with nanopore sequencing*, *J. Exp. Bot.* **68** (2017) 5419-5429
26. D. Bologini, N. Bartalucci, A. Mingrino, A. M. Vannucchi, A. Magi, *NanoR: A user-friendly R package to analyze and compare nanopore sequencing data*, *PLoS ONE* **14** (2019) e0216471.
27. <https://nanoporetech.com/products/voltrax> (datum pristupa 1. rujna 2020.)