

## Yeni Nesil Nükleotid Dizileme Metotlarının Biyokimyasal Temelleri

İsmail AKYOL<sup>1</sup>

Mehmet Ali YILDIZ<sup>2</sup>

Esen TUTAR<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniv. Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Kahramanmaraş

<sup>2</sup>Ankara Üniv. Ziraat Fakültesi, Zootehni Bölümü, Ankara

<sup>3</sup>Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniv. Fen Bilimleri Enst., Biyomühendislik ve Bilimleri ABD, Kahramanmaraş

✉:ismailakyol@ksu.edu.tr

Geliş (Received): 20.05.2016

Kabul (Accepted): 25.07.2016

**ÖZET :** Sanger ve Maxam-Gilbert dizileme metotları birinci nesil dizileme olarak ifade edilmektedir. Zincir sonlandırma yaklaşımı ile dizileme yaygın olarak kullanılmış ve insan genomunun ilk projesi bu yöntem ile tamamlanmıştır. Ancak metodun hız, kolaylık ve maliyet açılarından sınırlamaları bulunmaktadır. Yeni nesil dizileme yaklaşımları çok sayıda paralel analiz, yüksek verimlilik ve düşük maliyetler açısından önem taşımaktadır. Bu derlemede, yeni nesil dizileme işlemleri için gerekli olan yeterli miktarda ışınmayı sağlayacak kalıp DNA amplifikasyonunun yapıldığı Emülsiyon PCR yaklaşımı açıklanmıştır. Ayrıca yeni nesil dizileme yaklaşımları; pirodizileme, dönüştürülebilir terminatör dizileme, ligasyon yaklaşımli dizileme, nanopor dizileme ve yarı iletken dizileme yaklaşımlarının biyokimyasal temelleri açıklanmıştır.

**Anahtar kelimeler:** emülsiyon PCR, pirodizileme, dönüştürülebilir terminatör dizileme, ligasyon dizileme, nanopor dizileme, yarı iletken dizileme

### Biochemical Basis of New Generation Nucleotide Sequencing Methods

**ABSTRACT :** Sanger and Maxam-Gilbert sequencing methods are pronounced as the first generation sequencing. Chain termination sequencing approach is widely used and the first human genome project was completed by this method. However, this method has certain limitations especially in terms of speed, ease of use and cost. New generation sequencing approaches are important thanks to their capacity to work with many parallels, high efficiency and low cost. In this review, emulsion PCR approach, which is required for the amplification of template DNA so that it can produce sufficient amount of emission on the next generation sequencing, is described. Moreover, biochemical basis of the new generation sequencing approaches; pyro sequencing, reversible terminator sequencing, ligation sequencing, nanopore sequencing and semiconductor sequencing, are also described.

**Key words:** emulsion PCR, pyrosequencing, reversible terminator sequencing, ligation sequencing, nanopore sequencing, semiconductor sequencing

### GİRİŞ

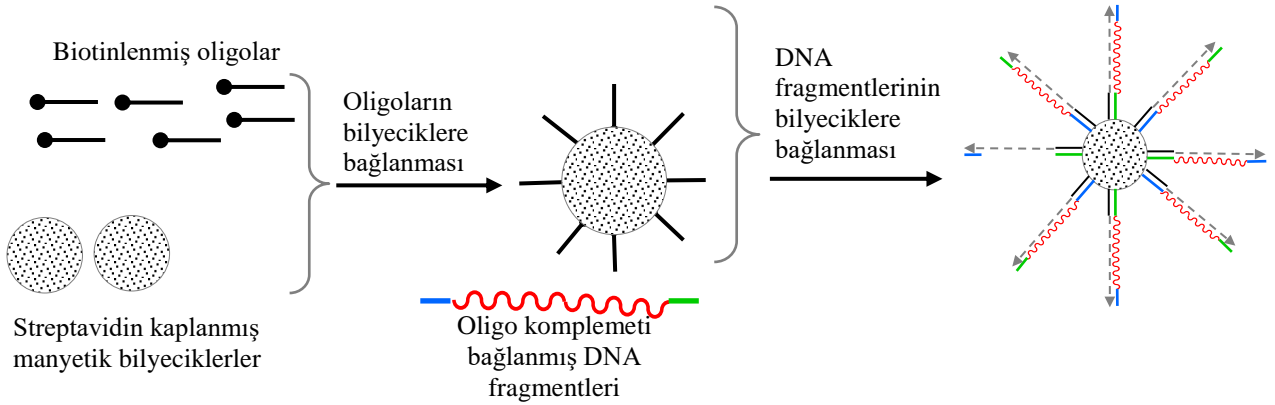
DNA dizileme biyolojik bilimlerin önemli bir çalışma alanıdır. Zincir sonlandırarak DNA dizileme yaklaşımı (Sanger ve ark., 1977) ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) (Mullis ve ark., 1983) birçok moleküler biyoloji alanında çok yaygın olarak kullanılmaktadır. İnsan genom projesinin tamamlanması ile genetik farklılıklar fenotip ile ilişkilendirmiş ve genom çalışmalarına referans teşkil etmiştir. Birinci nesil nükleotid dizileme metotları 1977 yılında tanımlanan enzimatik dideoksi tekniği (Sanger ve ark., 1977) ve Maxam ve Gilbert tarafından tanımlanan kimyasal degradasyon yöntemleridir (Maxam ve Gilbert, 1977). Bu metotlar DNA dizilemeyi otomatik yapabilecek şekilde geliştirmişler (Smith ve ark., 1986, Ansorge ve ark., 1987) ve Biosytem ve Pharmacia-Amersham, daha sonra General Electric (GE) Healthcare olarak ticarileşmiştir. Sanger yöntemi, otomatize olarak ilk defa floresan EMBL tekniği ile genom bölgesinin dizilenmesinde kullanılmıştır (Edwards ve ark., 1990). ABI ve Amersham firmaları paralel analiz ile 384 örneği dizileyebilecek kapillar sistemi ticarileştirmiştir. Robotik numune hazırlama üniteleri ile Sanger tekniği kullanılarak insan genomunun dizilenmesine imkân vermiştir.

İnsan Genom Projesinin başarılı bir şekilde tamamlanmasında kullanılan Sanger dizileme metodu bu özelliği ile DNA dizilemenin merkezinde bulunduğundan dolayı yeni gelecek teknolojilerin konvansiyonel metotlara oranla kabul görmesi kolay olmamıştır (Ansorge, 2009). Ancak ideal DNA dizileme teknolojisi hızlı, doğru, kolay kullanılabilir ve ucuz olmalıdır. Bu açılarından bakıldığında, Sanger metodunun hız, kolaylık ve maliyet açılarından sınırlamaları bulunmaktadır. İkinci nesil dizileme teknolojileri çok sayıda paralel analiz, yüksek verimlilik düşük maliyet açısından Sanger metodunun sınırlamalarını gidermektedir. Yüksek verimli yeni nesil DNA dizileme teknikleri biyolojik bilimlerde hızlı, güvenilir ve kullanım kolaylığı sağlayan fırsatlar açmaktadır. Yeni nesil dizileme metotları kullanışlı ve pratik olmalarının yanında veri analizleri ve genomların anlaşılmasındaki biyolojik açıklamaları hala sınırlıdır. Yeni nesil DNA dizileme yaklaşımı geliştiren çalışma grupları ve bu tekniğin laboratuvar kullanıcıları, Sanger dizileme tekniğinin floresan olarak işaretlenmiş nükleotidlerin kullanılması, uzunlukları birbirinden sadece bir nükleotid farklı DNA fragmentlerinin ayrılmasında agaroz jel yada polimerin gerekliliği, nispeten düşük sayıda örnek analiz edilebilirliği, numune hazır-

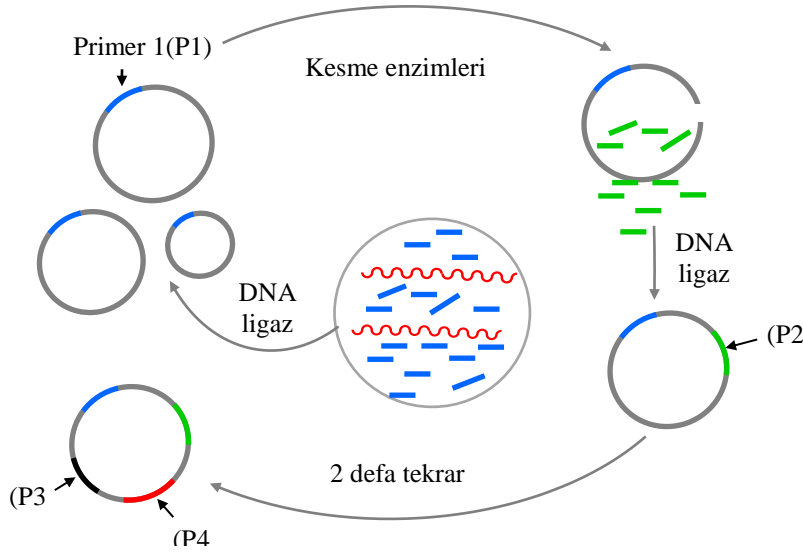
lama zorlukları ve otomasyondaki sınırlamaların neler olduğunu bilmektedirler. Bu sınırlamaların giderilmesi çabaları jel kullanılmayan ve nükleotid dizilemenin eşzamanlı yapılabilirdiği yeni nesil dizileme tekniklerin gelişimini başlatmıştır.

Yeni nesil DNA dizileme teknikleri hız ve verimlilik sağlamaktadır. Sanger dizileme tekniği ile genom dizileme projeleri uzun zaman alır iken günümüz dizileme yaklaşımları ile kısa sürede (bir hafta) tamamlanabilmektedir. Yeni nesil dizileme yaklaşımlarına biyokimyasal reaksiyonlar açısından bakıldığında, Sanger dizilemeden farklı biyokimyasal temelleri bulunmaktadır. İkinci nesil dizileme teknolojisinin biyokimyasal yaklaşımı DNA dizilerini sentez ile dizileme ve ligasyon ile dizileme yaklaşımlarını içermektedir (Fuller ve ark., 2009, Liu ve ark., 2012). Yüksek maliyeti nedeni ile yeni türlerin genom dizilemelerinde ve *de novo* dizilemelerde sınırlamaları bulunmaktadır. İkinci nesil dizileme teknolojileri hızlı, yüksek verimlilik ve düşük maliyet özellikleri ile moleküler uygulamalarda yer almıştır. Ancak ikinci nesil dizilemeler PCR amplifikasyonuna dayalı olduklarından dolayı dizilemede yanlış okumalar teknolojinin ana problemini oluşturmaktadır. İkinci nesil dizilemenin artan kullanımı ve yeni modifikasyonlarına rağmen üçüncü nesil dizileme yeni bir yaklaşım getirmektedir. Üçüncü nesil dizilemenin iki temel özelliği bulunmakta; i- dizilemeden önce PCR işlemi gerekliliğini ortadan kaldırarak dizileme kısa zamanda yapılması, ii- sinyallerin (elektrik akımı) eş zamanlı olarak algılanmasıdır. Bu derleme çalışmasında yeni nesil dizileme metotlarının biyokimyasal temelleri ve gelişim süreçleri detaylı olarak açıklanmıştır.

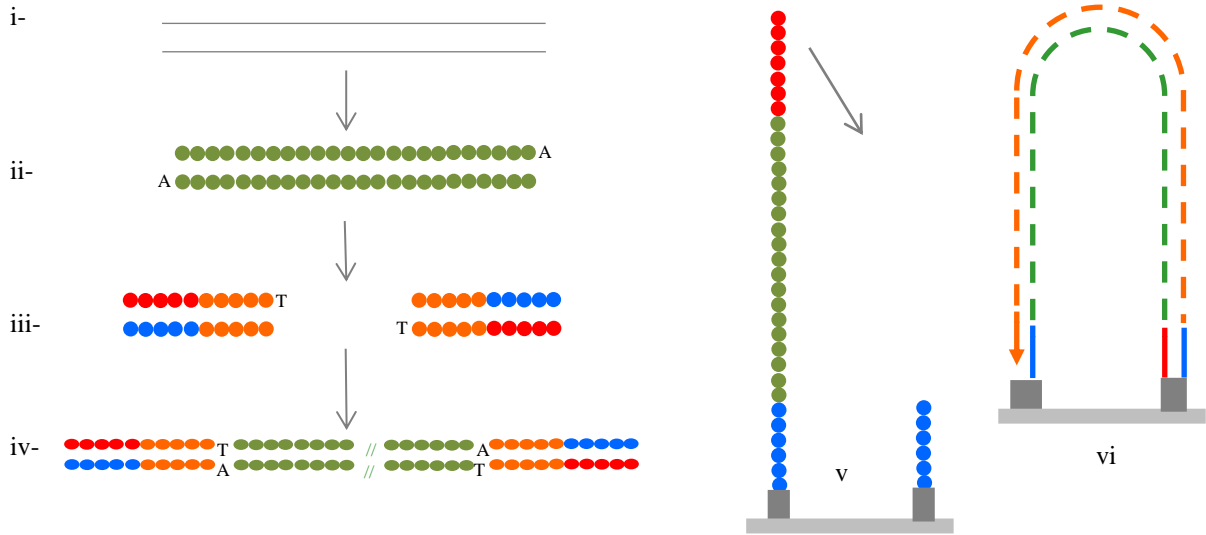
### Emülsiyon PCR



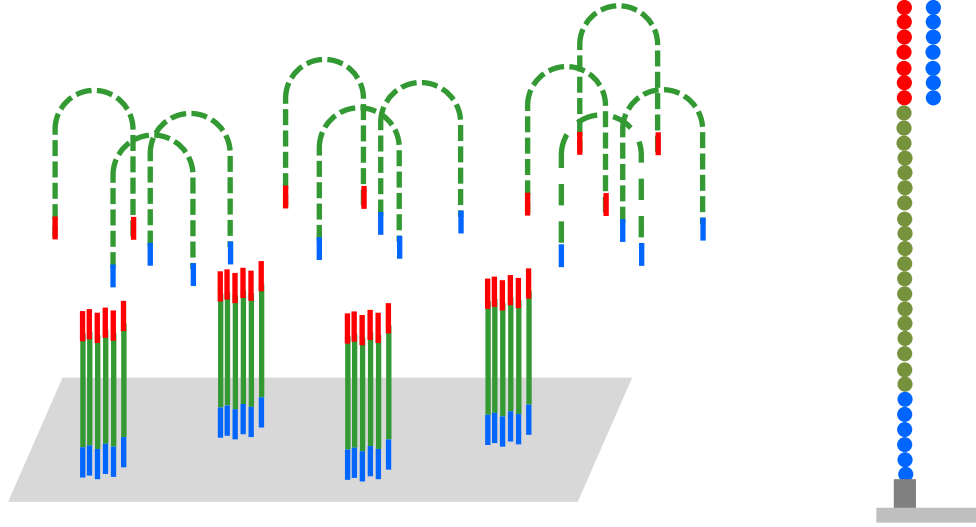
Şekil 1. Shendure ve Ji, (2008)'den uyarlanmış emülsiyon PCR amplifikasyonu. Adaptör diziler (yeşil ve mavi) kalıp DNA'ya ligasyon ile veya PCR başlangıcındaki bir adım ile eklenmiş ve adaptör dizilerin yardımı ile yönetilebilen DNA fragmenti oluşturulmuştur. Fragmente eklenmiş adaptör diziler, bilyeciklere kovalent olarak bağlanmış oligonükleotidlerin karşılığı olduğu için fragmentler hibridize olarak bilyelere bağlanmaktadır. Kalıp DNA fragmentinin ve bilyeciklerin en az bir tanesinin birbirine bağlanmasını sağlamak için dikkatlice ve homojen olarak karıştırılmalıdır. Sonra bilyecikler su ve yağ karışımında emülsifiye edilerek her bir bilyecik/kalıp DNA kombinasyonu için PCR mikroreaktörleri oluşturmaktadır. Emülsiyon PCR esnasında, bilyeciklerin yüzeyi kalıp DNA kopyası ile kaplanmakta ve takiben bilyecikler array üzerine bırakılır ve bireysel olarak amplifiye edilmiş kalıp DNA'lar ayrı ayrı dizilenmektedir.



Şekil 2. Shendure ve Ji, (2008)'den uyarlanmış DNA nanotopları kullanılarak Emülsiyon PCR amplifikasyon yaklaşımı. Genomik DNA fragmentlerine adaptör oligonükleotidler ligasyon ile eklenmiş ve iki uçtaki adaptörlerin ligasyon işlemi ile fragmentler halka şeklinde birleştirilmiştir. Halkasal DNA fragmenti kesme enzimleri ile kesilerek, yeni (P2) adaptör diziler kalıp DNA zincirinin içerisine gömülmektedir. Ligasyon işlemi başka (p3 ve P4) adaptör oligonükleotidler içinde tekrarlanarak dört farklı oligonükleotid adaptörü içeren halkasal fragmentler oluşturulmaktadır. DNA polimeraz enzimi çoklu adaptörü içeren kalıp DNA'yı (DNA nanoball) çoğaltmakta ve nano toplar array üzerine bırakılarak ve bireysel olarak amplifiye edilmiş kalıp DNA'lar ayrı ayrı dizilenmektedir.



Şekil 3. İzotermal köprü amplifikasyonu. Kalıp DNA fragmentleri adaptör oligonükleotid dizilere bağlandıktan sonra (turuncu ve kırmızı) denatüre edilerek tek zincir DNA oluşturulmaktadır. Akış hücrelerinin yüzeyine kovalent olarak tutturulan yakalayıcı oligonükleotidler sayesinde kalıp DNA'ya eklenen adaptör oligonükleotidler vasıtası ile yakalayacaktır. Yakalayıcı oligonükleotidler primer olarak kullanılarak kalıp DNA kopyalanmakta ve daha sonra tekrar denatüre edilmektedir. Yeni sentezlenen DNA zinciri, yakalayıcı oligonükleotide doğru bükülerek hibridize olmakta ve köprü yapısını oluşturmaktadır. Yakalayıcı oligonükleotid, primer görevi yaparak DNA zincirini tekrar çoğaltacaktır. Shendure ve Ji, (2008)'den uyarlanmıştır).



Şekil 4. Shendure ve Ji, (2008)'den uyarlanan akış hücrenin yüzeyinde çoklu klonal grupların oluşturulması.

#### **Pirodizileme (Pyrosequencing) Tekniği ve Biyokimyasal Temeli**

Pirodizileme (Pyrosequencing) DNA zincirindeki nükleotid sırasını, DNA polimeraz enzimi tarafından sentezlenen yeni DNA zincirine nükleotid eklenmesi aşamasında belirleyen nükleotid dizileme yaklaşımıdır. Teknik, işaretlenmiş primer, işaretlenmiş nükleotid (ddNTP) ile uzayan DNA zincirinin sonlanması ve jel elektroforez kullanmadan dizileme yapmaktadır. Teknik kullanılarak tek nükleotid polimorfizm analizi ve genom dizileme (Margulies ve ark., 2005) çalışmaları yapılmıştır. Ronaghi ve ark., (1996) pirodizileme tekniğinin biyokimyasal teorisini açıklamışlardır. Bu metot ile nükleotid dizi belirlenmesi, DNA polimeraz enzim aktivitesi ile kalıp DNA zincirine uygun eklenen her bir nükleotidin yeni enzimatik reaksiyonları başlatması ve diğer kemolüminans enzimlerle oluşturulan ölçülebilir floresan ışımının belirlenmesi esasına dayanmaktadır. Pirodizileme, nükleotid dizilemeyi DNA polimeraz aktivitesine eş zamanlı olarak belirlemektedir. Pirodizileme tekniği şematik olarak Şekil 5'de gösterilmiştir.

Kalıp tek zincir DNA (ssDNA) dizileme primeri ile hibridize edildiğinde adenozin 5' fosfosülfat (APS) ve lüsiferin substratları; DNA polimeraz, ATP sülfirilaz, lüsiferaz ve apiraz ile inkübe edilmektedir (Şekil 5). Pirodizileme reaksiyonları (R1-4) APS ve PPI'nin ATP sülfirilaz enzimi ile oluşan ATP'nin serbest lüsiferaz sistemi belirlenmesi temeline dayanmaktadır. Kalıp DNA zinciri sabit ancak A, G, C ve T nükleotidlerinin her biri sıra ile 3' uca dögüsel olarak eklenir. Reaksiyon sonunda kalan veya 3' uca eklenmeyen her bir nükleotid eklenme aşamasından sonra reaksiyondan apiraz

aktivitesi ile uzaklaştırılır ve bir sonraki nükleotid eklenme aşamasına geçilir.

Biyokimyasal ışımaya, kalıp DNA'nın henüz eşleşmemiş nükleotidine karşı bağlanan nükleotid 3' uca eklendikten sonra gerçekleşen biyokimyasal reaksiyonlar ile ışımaya neden olmaktadır. Nükleotid eklenmesi olmadığı zaman reaksiyonlar başlamaz ve ışımaya gerçekleşmez. DNA zinciri sentezinde, dNTP uzayan DNA zincirinin 3' ucuna eklenmekte ve iki fosfat (PPi) pirofosfat formunda açığa çıkmaktadır (R1). PPi ve adenozin 5' fosfosülfat (APS) ATP sülfirilazı kullanarak ATP'ye dönüştürülecektir (R2).

ATP lüsiferaz enzimi, lüsiferin ve ATP'yi substrat olarak kullanarak lüsiferini oksilüsiferine dönüştürmekte ve görünebilir ışık yaymakta (R3) ve bu reaksiyon 0.2 s gibi kısa bir sürede gerçekleşmekte ve ışımaya kamera tarafından algılanmaktadır. ATP sülfirilaz enzimi (ATP:sulfate adenyltransferase, EC 2.7.7.4) metabolizmada inorganik sülfatın (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) başlangıç reaksiyonunu katalize etmektedir. ATP sülfirilaz DNA polimeraz enziminin aktivitesinin izlenmesinde ve DNA dizilemede kullanılmaktadır. Enzim, *Saccharomyces cerevisiae*, *Penicillium chrysogenum*, fare karaciğeri, ıspanak ve kabaktan saflaştırılabilmektedir. Ayrıca biyoteknolojik olarak ATP sülfirilaz geni prokaryotlardan, ökaryotlardan, bitkilerden ve hayvanlardan klonlanarak üretilmiştir. Dizileme reaksiyonlarında, yüksek konsantrasyondaki ATP sülfirilaz kullanılması yanlış ışımının kaynağı olabileceği ancak bu yanlış ışımaya, düşük konsantrasyonda ATP sülfirilaz kullanılarak optimize edilmiştir (Karamohamed ve Nyren, 1999).

DNA polimeraz enziminin uzayan zincirinin 3' ucuna nükleotid eklenmesi (0.5 s), floresan ışımaya reaksiyonu ve algılanması 3s'de tamamlanmaktadır. Yayılan ışık



floresan gürlütüsünün birbirinden ayrılabilmesi için dATP yerine dATPαS kullanılmıştır (Ronaghi ve ark., 1996). dATP lüsiferaz için substrat olarak kullanılmakta ve yanlış sinyal vermektedir. Gharizadeh ve ark., (2002) saf 2'-deoxyadenosine-5'-O'-(1-thiotriphosphate) Sp-izomer kullanmış ve iki kat daha uzun nükleotid zincirini okuyabilmiştir. Ayrıca Sp-izomeri daha düşük konsantrasyonda nükleotid kullanımı ve çoklu T bölgelerinin okuması ve daha etkin DNA polimeraz aktivitesi sağlanmıştır.

Modifiye edilmiş nükleotidler apiraz aktivitesini olumsuz etkilemekte özellikle uzun zincir okumalarında apiraz inhibe olmaktadır. Alternatif nükleotid 7-deaza-2'-deoxyadenosine-5'-triphosphate DNA polimerazın nükleotid dizilemesine ve apiraz aktivitesine birçok nükleotid eklenmesinden sonra olumlu etki yapmıştır (Eriksson ve ark., 2004b). Yöntem bir dizi enzim reaksiyonlarına bağlı olarak çalışmakta dolayısı ile her bir enzimin seçimi ve konsantrasyonu dizileme reaksiyonunun performansı için kritik öneme sahiptir. Piro-dizilemede 3'→5' ekzonükleaz aktivitesi olmayan DNA polimeraz I (Klenow fragment) kullanılmaktadır. Ekzonükleaz olmayan T7 DNA polimeraz (Sequense polymeraz) (Gharizadeh ve ark., 2004) tarafından kullanılmıştır. Klenow fragment DNA polimeraz ile karşılaştırıldığında; Sequense DNA polimeraz ile primer dimer etkisi azaltılabilmemiş, yanlış okumaya sebep olan düğüm yapılar elemine edilmiş, beş Timin bazı içeren homopolimerik bölgeler ve daha uzun zincirler okunabilmiştir. Sequense ayrıca 7-deaza-2'-deoksiadenosine-5'-triphosphate ile birleştirilmiştir (Eriksson ve ark., 2004b).

Tek zincir bağlanma proteinlerini birçok organizma DNA replikasyonunda DNA sentezini artırmak için kullanmaktadır. Tek zincir bağlanma proteinlerini kalıp DNA'ya primer bağlanmasından sonra ancak piro-dizileme reaksiyonundan önce eklenmiş ve dizileme kalitesini iyileştirmiştir (Ronaghi, 2000). Bu proteinlerin reaksiyona eklenmesi ile 30 nükleotitten daha fazla nükleotidin dizilenmesini sağlamıştır. Bu dizileme iyileştirilmesi; enzimlerin etkinliğinin artması, yanlış eşleşmelerin engellenmesi, reaksiyon esnasında sinyal yoğunluğunun artırılması, dizilemenin doğruluğunun artırılması ve daha uzun zincirin dizilenebilmesi avantajlarını sağlamıştır.

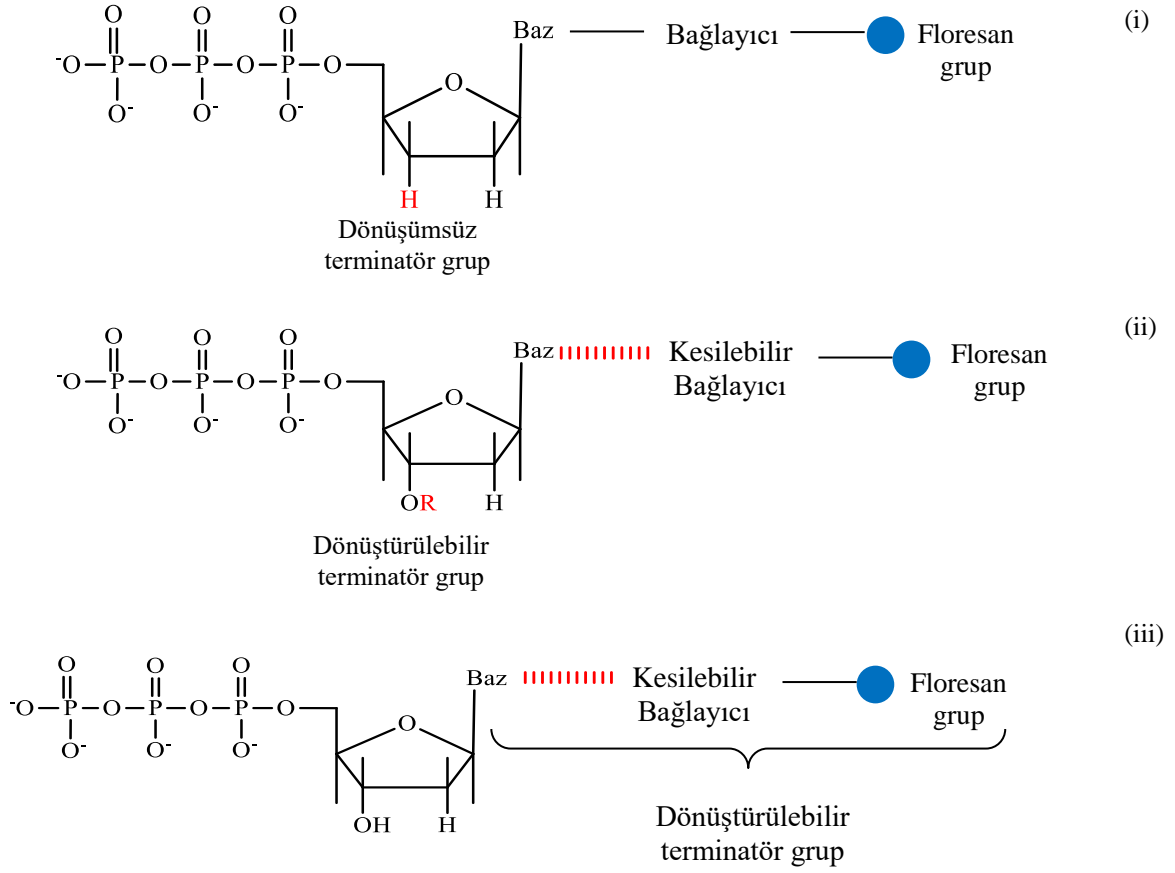
Dizileme reaksiyon sıcaklığının optimizasyonu; lüsiferaz'ın sıcaklık hassasiyetinden dolayı araştırılmamıştır. Glisin betanin ile ışılan lüsiferaz stabilize edilerek dizileme işlemi yaklaşık 10 °C artırılmış ve 37 °C'ye çıkarılmıştır (Eriksson ve ark., 2003, Eriksson ve ark., 2004a). Sıcaklık yükseltilmesi ile enzimlerin aktiviteleri iki katına çıkmış ve dizileme iyileştirilmiştir. Apiraz, pirofosfat ve blok oligonükleotidlerin kombinasyonu ile kalıp DNA bir adımda oluşturulup dizileme yapılabilmektedir (Nordstrom ve ark., 2002). Piro-dizileme diğer önemli gelişmesi, teknikte çoklu oligonükleotidlerin kullanılmasıdır (Gharizadeh ve ark., 2003a, Gharizadeh ve ark., 2003b, Gharizadeh ve ark., 2005). Bu modifikasyon ile dizilemeye iki veya daha fazla primerin kullanılması eklenmiştir. Oligo-nükleo-

tidler kalıp DNA zincirine hibridize olmakta ve DNA dizileme reaksiyonları için primer görevi yapmaktadırlar. Yeni yaklaşım farklı genotipler için uygun ve spesifik olmayan amplifikasyonlar oluşturmaktadır. Yeni yaklaşım yüksek ve düşük miktar DNA'ların dizilenebileceğini göstermiştir.

Piro-dizilemenin biyokimyasal yaklaşımı 2005 yılında 454 life science tarafından geliştirilerek otomatize edilmiştir. Bu sistem DNA fragmentlerini, özel bilyeciklere bağlayacak adaptör oligonükleotidlere ligasyon ile bağlamıştır. Bir sonraki adımda DNA polimeraz enzimi ve primerler bilyeciklere eklenmekte ve çipler üzerinde bulunan bilyeciklere, etiketlenmemiş nükleotidler sıra ile eklenmekte ve komplement DNA zinciri sentezi başlamaktadır. Bir sonraki nükleotidin uzayan zincire DNA polimeraz ile eklenmesi ile açığa çıkan pirofosfat yayılan ışık ile algılanmaktadır. Her bir adımda eklenen nükleotidin hangisi olduğu bilinmekte ışımının varlığı bir sonraki nükleotidin uzayan DNA zincirine eklendiğini göstermektedir. Yöntem nükleotid okuma uzunluğunu 400-500 bp kadar çıkarmıştır ve bakteri, hayvan ve insan genomu dizilemeye uygulanabilmektedir.

#### **Dönüştürülebilir Terminatör Nükleotid Kullanarak Dizileme**

Dönüştürülebilir terminasyon dizileme teknolojinin biyokimyasal temeli Li ve ark., (2003) tarafından açıklanmıştır. Sanger metodunda kullanılan modifiye nükleotidler (ddNTP) 3' dönüşümsüzdür ve primer uzamasını reaksiyonda kalıcı olarak sonlandırmaktadır (Şekil 6i). Ancak dönüştürülebilir terminatör nükleotidler primer uzamasını sadece belli bir süre için sonlandırabilmektedir. Primer uzamasını anlık bloke edebilen sonlandırıcılar temelde iki farklı grupta incelenebilir (Litosh ve ark., 2011). Bunlar 3'-O-bloke edilmiş dönüştürülebilir sonlandırıcılar (Şekil 6-ii) ve 3' ucu bloke edilmemiş dönüştürülebilir sonlandırıcılar (Şekil 6-iii). Birinci grup dönüştürülebilir dizi sonlandırıcı nükleotidler 3' uca bağlı OH ucuna oksijen eklenmesi ve baz grubuna uzaklaştırılabilecek floresan etiket eklenmesi ile oluşturulmaktadır (Chen ve ark., 2010, Hutter ve ark., 2010). Diğer grup terminatörlerde ise 3' bloke edilmemiş ve floresan grup baz grubuna bağlanmıştır (Şekil 6 iii). Eklenmiş floresan grup, haberci rolünün yanında primer uzaması esnasında dönüşümlü terminasyon rolünün bir parçasıdır. 3'-bloke edilmiş dönüştürülebilir terminatör daha etkin bir terminasyon sağlar iken 3' ucu bloke edilmemiş terminatöre floresan grup uzaklaştırıldıktan sonra DNA polimeraz tarafından daha kolay nükleotid eklenmesi yapılabilir. 3'-OH bloke edilmiş farklı dönüştürülebilir terminatörler tanımlanmıştır. 3'-OH ucu O-NH<sub>2</sub> (Chen ve ark., 2010, Hutter ve ark., 2010), O-ally (Guo ve ark., 2010) ve -O-azidomethy (Bentley ve ark., 2008) dönüştürülebilir terminatörler bağlanarak farklı terminatörler oluşturulmuştur. Dönüştürülebilir terminatörler, 3'C bloke edilmesinde ve floresan grubun uzaklaştırılmasında yüksek oranda uygulanabilir olduğu tespit edilmiştir.



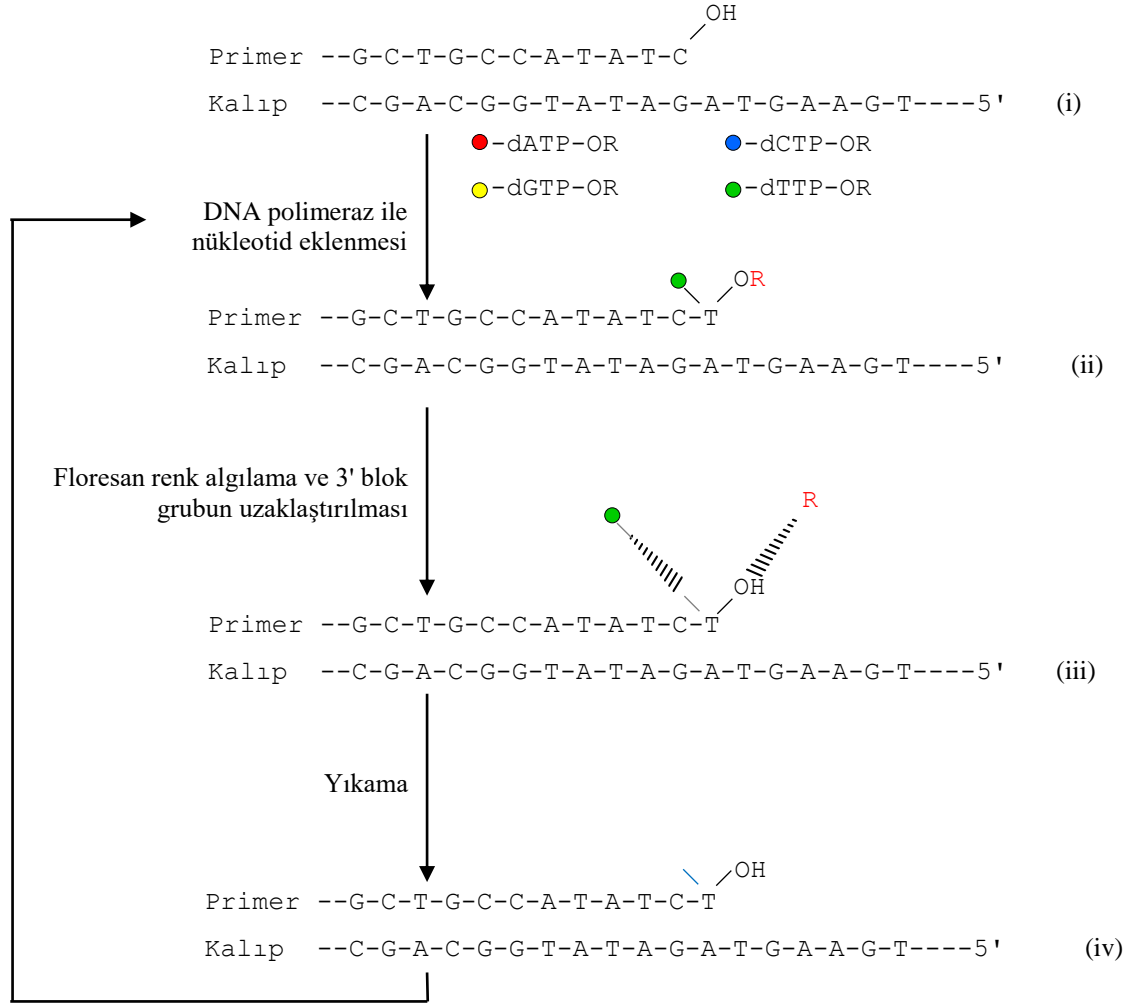
Şekil 6. Gardner ve ark., (2012)'dan uyarlanmış dönüştürülebilir nükleotitin şematik gösterimi.

Helicos BioSciences tarafından geliştirilen 3' uç bloke edilmemiş sanal terminatör tek molekül dizilemede kullanılmış ve gelişmekte olan üçüncü nesil dizilemede kullanılabilmiştir (Bowers ve ark., 2009). Ayrıca 3' ucu serbest ve UV ışık ile floresan grubu uzaklaştırılabilecek özellikli nükleotidler geliştirilmiştir (Wu ve ark., 2007, Gardner ve ark., 2012).

Illumina platformu tarafından ikinci nesil dizileme olarak tanımlanan dönüştürülebilir dizileme teknolojisi, dönüştürülebilir nükleotid kullanılarak sentez yaklaşımı ile dizileme yapmakta ve kalıp DNA zincir dizilemesini adım adım primer uzaması ile belirlemektedir. Dönüştürülebilir terminasyon dizileme işlemi: i- dizilenecek zincir ve primeri katı destek ünitesine tutturulması ve dizileme primerinin hibridizasyonu, ii-primer uzamasının bir nükleotid eklendikten (primer + 1) sonra dur-

ması, iii- bağlanmayan nükleotidler yıkandıktan sonra +1 olarak eklenen nükleotide bağlı floresan grubun algılanması, iv- +1 nükleotidine bağlı floresan baz ve 3' bağlı blok grupların uzaklaştırılması, v-yıkama işleminin tekrarlanması ve yukarıdaki ii-iv aşamalarının tekrar edilmesi işlemini kapsamaktadır (Şekil 7).

Dönüştürülebilir terminatör dizileme primeri tasarlandıktan sonra DNA polimeraz enziminin dönüştürülebilir nükleotidleri yüksek etkinlik ve doğrulukta yeni sentezlenen zincire eklemesi gerekmektedir. Uygun DNA polimeraz enzimleri genellikle primere nükleotid ekleme potansiyellerine göre değerlendirilmektedir (Chen ve ark., 2010, Hutter ve ark., 2010). Dönüştürülebilir olarak sonlandırılmış nükleotidler ile uyumlu çalışabilen ticari DNA polimeraz enzimleri bildirilmiştir (Guo ve ark., 2008, Hutter ve ark., 2010).



Şekil 7. Dönüştürülebilir nükleotid ile dizileme yaklaşımının şematik gösterimi. Guo ve ark., (2008)'den uyarlanmıştır.

### Dönüştürülebilir Terminatör Dizileme Yaklaşımını Kullanan Dizileme Platformları

Dönüştürülebilir nükleotidler avantajlarından dolayı, dönüştürülebilir sonlandırılmış dizileme teknolojisi yeni nesil dizileme platformları tarafından ilgi görmüş ve bu teknoloji Helicos dizileme Illumina/Soloxa tarafından geliştirilmiştir (Shendure ve Ji, 2008, Metzker, 2010). Floresan etiketleri kullanarak duyarlı, yüksek doğrulukta ve çok az miktarda örnek kullanarak yapmaktadır. Ayrıca dönüştürülebilir terminasyon kullanımı pirodizileme ile zor olan homopolimerik bölgelerin tanımlanmasını yapabilmektedir (Bentley, 2006; Fields, 2007). Solexa dizileme 2006 yılında ticarileşmiş ve 2007 yılının başlarında Illumina tarafından satın alınmıştır. Her biri farklı floresan boya ile işaretlenmiş ve dönüştürülebilir dört yeni terminatör nükleotid özel DNA polimeraz ile kalıp zincire uygun dizilenmektedir.

DNA dizileme reaksiyonu ve DNA sentezi reaksiyonu karışımı (primerler, herbiri farklı floresan

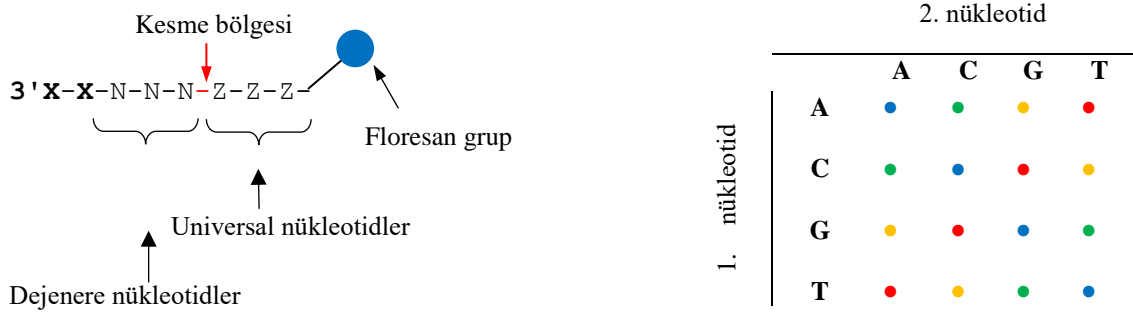
boyalarla işaretlenmiş dört dönüştürülebilir terminatör nükleotid ve DNA polimeraz) lam yüzeyine eklenmektedir. Kalıp DNA zincirine göre sentezlendikten sonra, terminatör nükleotidin destek yüzeydeki yeri belirlenebilir ve floresan boya sayesinde nükleotid CCD kamera ile belirlenebilir. Zincirin 3' ucunda bulunan terminatör nükleotidden floresan grup uzaklaştırıldıktan sonra sentez döngüsü tamamlanmaktadır. Dizi okuma uzunluğu yaklaşık 35 nükleotid uzunluğa kadar uzatılmıştır. En az 40 milyon poloninin nükleotid dizilenmesi çok yüksek dizi verimliliğinde aynı anda belirlenmektedir. 2008 yılında Illumina bir üst model Genome Analizör II'yi geliştirmiş ve bu model önceki modele göre üç kat daha fazla çıktı üretmektedir. Sistem her bir çalışmada en az 1.5Gb single-read data, eşlenmiş uçta 3 Gb data üretmektedir. 36 döngülü bir reaksiyonun koşma süresi tek okuma için 2 güne düşürülmüş ve eşleştirilmiş uç okuması için 4 gün zaman almaktadır.



### Ligasyon Yaklaşımı ile Dizileme

Ligasyon ile nükleotid dizileme yaklaşımı, 1. ve 2. nükleotidleri bilinen, dört farklı ışına yapabilen 16 farklı probun (Şekil 8) kalıp DNA zinciri üzerine 1. ve 2. nükleotidler esas alınarak hibridize olmaları ve problemlerin ligasyon ile birbirine bağlanması temeline dayanmaktadır. Problemler sekiz nükleotid uzunlukta (oktomer), 1. ve 2. nükleotidleri probu tanımlayacak nitelikte ve 5' uca floresan molekül eklenmiştir. Ligasyon dizilemede ilk adım, dizilemeyi başlatacak primeri adaptöre bağlanmış DNA fragmentine hibridize edilmesidir. Dizilemede birbirinin dizi olarak aynı ancak uzunlukları aşamalı olarak bir nükleotid daha kısa (n, n-1, n-2, n-3 ve n-4) olan dört primer kullanılır ve konsensüs nükleotid dizisi bu primerlerin her biri ile belirlenmiş örüntü nükleotid dizi sonuçları birleştirilerek gerçekleştirilir. İkinci

adımda, primer bağlanmış dizilenecek DNA fragmentine ekiz nükleotid uzunlukta ve 5' ucu floresan olarak işaretlenmiş oktomer prob eklenecektir (Şekil 8). Problemlerin ligasyon işlemi primerin 5' ucuna probun 3' kovalent bağlanarak yapılmaktadır. Ligasyon işleminden sonra oktomer prob 5. ve 6. pozisyonlardan (N'Z) kesilerek yeni 5' uç oluşturularak yeni ligasyona zemin hazırlamakta ve ayrıca floresan grup uzaklaştırılırken probun floresan ışınması belirlenmekte dolayısı ile 1. ve 2. nükleotid olası şekilde (1/4 ihtimal ile) belirlenecektir (Şekil 8). Birinci probun floresan grubu uzaklaştırıldıktan sonra açığa çıkan serbest 5' ucuna ikinci prob ilk iki nükleotid vasıtası ile (6, 7) hibridize olmakta ve ikinci probun 3' ucu birinci proba kovalent bağlanmaktadır. Diğer beş prob aynı örüntüde uç uca bağlanarak zinciri sentezleyeceklerdir.



Şekil 8. Ligasyon dizileme yaklaşımında kullanılan oktomer probun şematik gösterimi.

Uygun problemlerin 1. ve 2. nükleotidi primerin 3' ucundaki ilk iki nükleotid ile tam olarak eşleşmekte diğerleri esnek bağlanmaktadır.  $p_n$  primeri ile prob ligasyonu işlemleri tamamlandıktan sonra, yeni sentezlenmiş zincir kalıp DNA fragmentinden denatürasyon ile ayrılmakta ve kalıp DNA fragmenti bu defa n-1 primeri ile hibridize edilerek oktomer prob ligasyon işlemleri aynı şekilde yapılacaktır.  $p_{n-1}$  primerinden elde edilen yeni sentez DNA zinciri ayrıldıktan sonra,  $p_{n-2}$  primeri kullanılarak problemler birbirlerine eklenecektir. Benzer işlemler  $p_{n-3}$  ve  $p_{n-4}$  primerleri ile de yapılmaktadır. Oktomer prob eklenmesi, ligasyon ve floresan grup uzaklaştırılması işlemlerini takiben her bir primerden ( $p_n$ ,  $p_{n-1}$ ,  $p_{n-2}$ ,  $p_{n-3}$  ve  $p_{n-4}$ ) sonra eklenen yedi potansiyel oktomer prob ile 35 nükleotid dizisi belirlenebilmektedir.

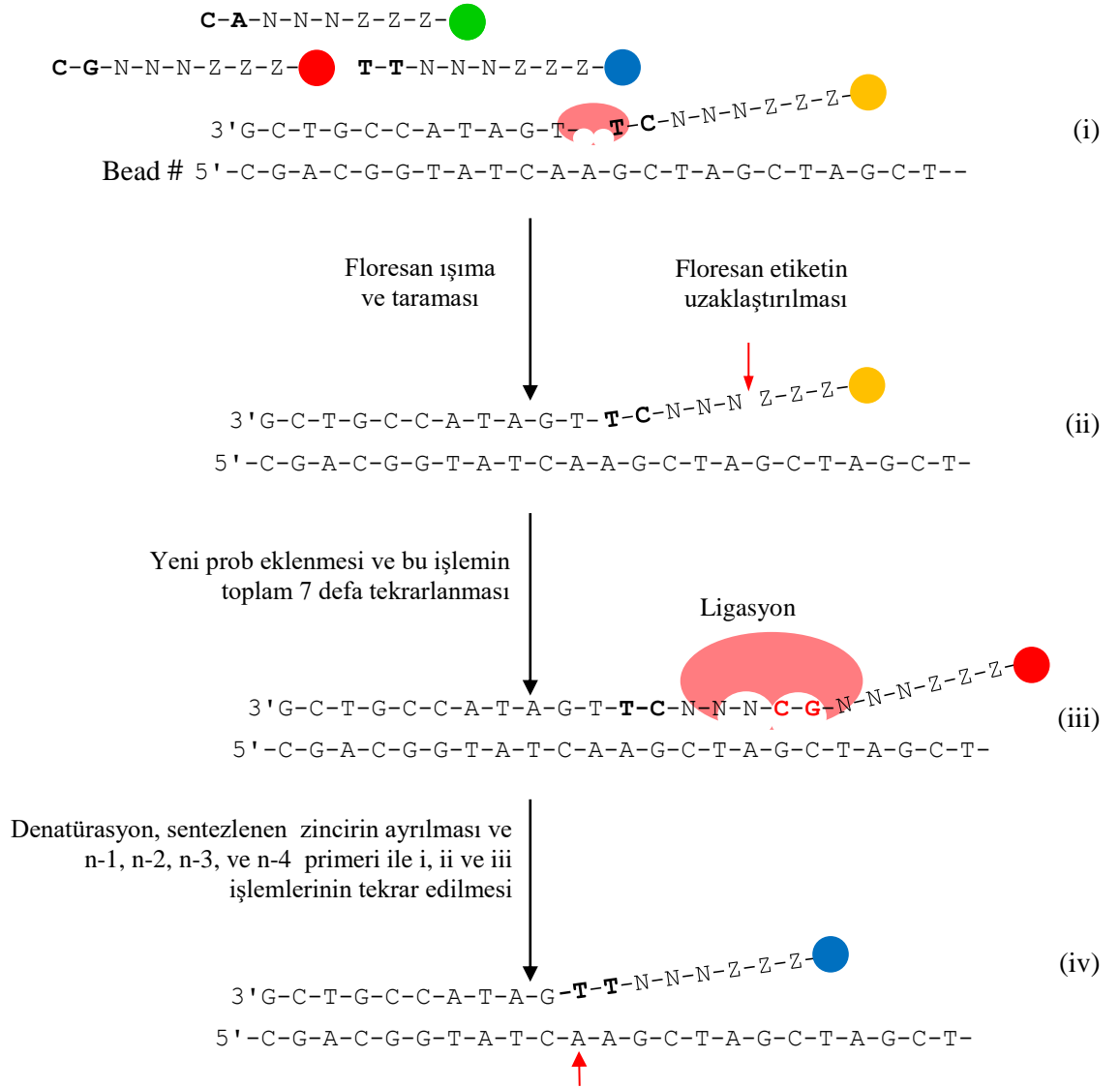
n nükleotid uzunlukta primerin hibridasyonunu takiben, yedi adımda gerçekleştirilen dizi oktomer prob hibridizasyonları ile DNA fragmentinin 1-2, 6-7, 11-12, 16-17, 21-22, 26-27 ve 31-32 pozisyonlarındaki ikili nükleotidler tahmin edilebilmektedir (Şekil 9). n-1 uzunlukta primer başlatıcı olarak kullanıldığında, -1,1,

5-6, 10-11, 15-16, 20-21, 25-26, 30-31 pozisyonundaki nükleotidleri belirlenecektir. Dizileme n-2 uzunlukta primer ile başlatıldığında, 4-5, 9-10, 14-15, 19-20, 24-25, 29-30, 34-35 pozisyonlardaki nükleotidler tanımlanacaktır. n-3 primeri ile DNA fragmentinde 3-4, 8-9, 13-14, 18-19, 23-24, 28-29, 33-34 pozisyonundaki nükleotidler belirlenerek dizi tamamlanacaktır. n-4 primeri kullanıldığında 35 nükleotid uzunlukta DNA fragmentinin her bir nükleotidi ikinci defa teyit edilerek fragment dizilenmiş olacaktır (Çizelge 1). Sadece bir fragment için detaylandırılan dizileme işlemi, 50 milyondan daha fazla bilyecikte paralel olarak belirlenecek ve sonuçta yüksek verimlilikte her bir işlemde ciga baz nükleotid belirlenebilecektir.

ABI SOLiD dizileme yaklaşımı ligasyon biyokimyasına bağlı olarak 2007 yılında geliştirilmiştir. Bu yaklaşımda, dizilecek DNA fragmentleri adaptör moleküllere bağlanmakta ve bilyeciklere tutundurulmaktadır. SOLiD 2.0 olarak geliştirilen teknolojinin ticari uygulamaları (Applied Biosystem her bir analizde dizi uzunluğunu 3 Giga bazdan 10 Gb olarak geliştirmiş ve analiz süresini 8.5 günden 4.5 güne kısaltmıştır.

Çizelge 1. Yedi farklı ligasyon probu ve beş farklı dizileme primerlerinin başlatıcı olarak kullanılması ile belirlenebilen nükleotidlerin pozisyonları

Dizileme Primerleri 3' -5'	Ligasyon Probları							
	1	2	3	4	5	6	7	
<sub>p</sub> n	#-G-C-C-A-T-A-G-T	1,2	6,7	11,12	16,17	21,22	26,27	31,32
<sub>p</sub> n-1	#-G-C-C-A-T-A-G	-1,1	5,6	10,11	15,16	20,21	25,26	30,31
<sub>p</sub> n-2	#-G-C-C-A-T-A		4,5	9,10	14,15	19,20	24,25	34,35
<sub>p</sub> n-3	#-G-C-C-A-T		3,4	8,9	3,14	18,19	23,24	33,34
<sub>p</sub> n-4	#-G-C-C-A		2,3	7,8	12,13	17,18	22,23	32,33



Şekil 9. Mardis, (2008)'den uyarlanmış ligasyon dizilemenin biyokimyasal gösterimi. i. Bilyeciklere (Bead) tutturulmuş DNA fragmenti, hibridize edilmiş primere ligasyon ile eklenmiş oktomer prob, ii. Probtan floresan grubun uzaklaştırılması, iii. ikinci probun 1. probun 5' ucuna ikinci probun eklenmesi iv. N-1 primeri ile ligasyon.

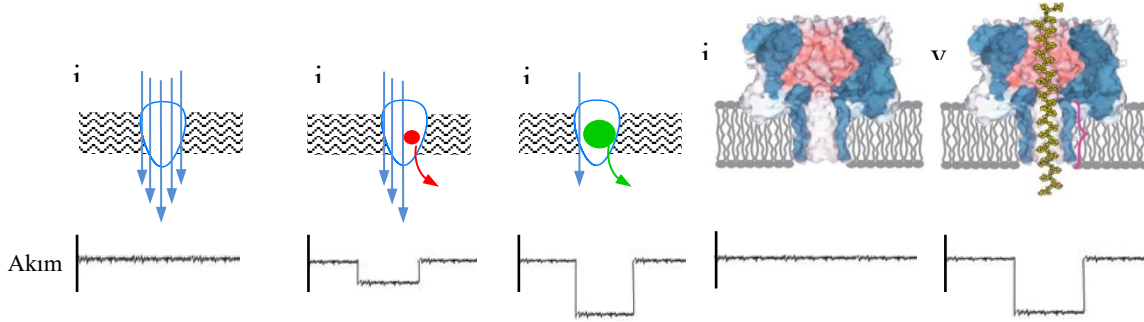
### Nanopor Teknolojisi ile DNA Dizilemesi

Oxford nanopor teknolojisi, dizileme maliyetin düşürülmesi ve enzime minimum miktarda bağlı olması avantajlarını sağlamaktadır. Teknik DNA polimeraz enzimi kullanımını sınırlandırmakta ve ligaz enzimi gerekliliğini ortadan kaldırmaktadır. Membran üzerinde por oluşumu sağlayan bakteriyel proteinler, hücrelerde organik moleküllerin, küçük iyonların ve hatta polinükleotidlerin transferlerini yapabilmektedirler.  $\alpha$ -hemolysin ( $\alpha$ -HL) proteini *Staphylococcus aureus* tarafından üretilen ve iyonların, suyun ve düşük molekül ağırlıklı moleküllerin hücre dışına çıkarılmasını sağlamaktadır (Bhakdi ve Tranumjensen, 1991).

Nanopor dizileme teknolojisinin önemli bir gerekliliği, membran üzerinde nano boyutta açıklık oluşturan proteinlerin membrana sabitlenmesidir. Bakteriyel  $\alpha$ -HL proteini yaklaşık 100 (10 nm) uzunlukta ve yarıçapı 1.4 nm ile 2.6 nm arasında değişmektedir. Bu proteinin elektriksel olarak dirençli polimer membran tabaka

üzerine sabitlenmesi ile membran üzerinde nükleotid transferlerinin yapılabileceği açıklık (nano por) oluşturulmaktadır.

Birbirinden nanopor membran ile ayrılan, iki sulu elektrolit ortamına küçük bir voltaj (~100mV) uygulandığında, pordan geçen iyonik akım standart elektrofizyolojik teknikler ile ölçülebilmektedir. Nano-pordan geçen iyonik akım membran üzerinden geçen voltajın kontrolü ile yapılmaktadır. Bu membran üzerinden sürekli bir iyonik akım geçirildiğinde, nano açıklıktan geçen biyolojik moleküllerin geçişleri sırasında akımda moleküle özgü karakteristik bir kesinti oluşmaktadır. Değişen bu akım bilgilerinin ölçülmesi ile bilinmeyen molekülün tanımlaması yapılabilecektir. Nanopor'dan geçen molekül akımı kısmen engellendiği için iyonik akım düşmektedir. Pordan geçen moleküllerin her biri iyonik akım miktarını farklı miktarlarda etkilediğinden dolayı moleküllerin tanımlamaları iyonik akımda meydana gelen değişiklik ile belirlenebilir (Şekil 10).



Şekil 10. Branton ve ark., (2008)'den uyarlanmış Nanopor dizilemenin şematik olarak gösterilmesi. Zincir dizileme iyonik akımın bloke edilmesi esasına dayanır. i-  $\alpha$ -hemolysin pordan iyonik akımın engelsiz geçişi ii, iii-farklı büyüklükte moleküllerin  $\alpha$ -hemolysin pordan geçerken akımı şiddetini düşürmesi moleküle göre etkilemesi iv-  $\alpha$ -hemolysin por v-  $\alpha$ -hemolysin pordan DNA polinükleotidinin geçişi.

Nanopor, tek zincir nükleik asit polimerinin yüksek verimlilikte analiz edilebileceği oldukça sınırlı bir açıklık sağlamaktadır. Membran üzerinde  $\alpha$ -HL proteinlerinin oluşturduğu porlardan tek zincir DNA'nın taşınabileceğini ve taşıma esnasında akım seviyesinin nükleotid varlığına bağlı olarak değişmektedir (Kasianowicz ve ark., 1996). Uygulanan akım seviyesindeki azalmalar tek zincir DNA molekülünün kanalı tıkadığını göstermektedir. DNA veya RNA polimerleri uygun çap büyüklüğünde nanopordan elektroforetik olarak geçirildiğinde, her bir nükleotid iyonik akımı seviyesini farklı miktarlarda değiştirmektedir. Tek zincir DNA ve RNA nükleotidleri, proteinin oluşturduğu nanopordan geçirildiğinde iyonik akımda oluşturduğu değişikliğe göre belirlenebilir. Sistemin analitik kapasitesi solüsyondaki moleküllerin elektroforetik alanda nano boyuttaki pordan taşınmasına bağlıdır. Bu sistem dört farklı nükleotidleri baz gruplarındaki farklılıklar ile birbirinden ayırmada kullanılabilir ve kilobaz uzunluktaki tek zincir genomik DNA, RNA veya PCR amplifikasyonu nükleotid etiketlemesi olmaksızın ucuz ve hızlı olarak dizilebilir.

RNA ve ssDNA polinükleotidlerinin akım değişikliğini nasıl etkilediği incelenmiş poli Sitozin RNA zinciri membran poru poli Adenin RNA zincirinden daha fazla bloke ettiği tespit edilmiştir (Akeson ve ark., 1999, Meller ve ark., 2000). 30 Adenin ve bunu takip eden 70 Sitozin içeren RNA zinciri dizisi belirlenmiştir (Akeson ve ark., 1999). Pürin ve pirimidin ribonükleotidlerindeki net ayırım deoksiribonükleotid ayırımında elde edilememiştir (Akeson ve ark., 1999). Ayrıca tek nükleotid ayırımı yapılamamaktadır çünkü  $\alpha$ -HL nanoporda iyonik akımının bloke edilmesi yaklaşık 10-15 nükleotid ile gerçekleşmektedir (Meller ve ark., 2001). Hayal kırıklığı yaratan bu ilk sonuçlar ucuz dizileme beklentilerini karşılamamasına rağmen geliştirilen tek bir molekül hassaslığında gelişmeler elde edilmiştir (Deamer ve Branton, 2002; Nakane ve ark., 2003; Healy, 2007). Elektrik alan kilobaz uzunlukta ssDNA molekülünü nanopor'dan taşıyabilmekte (Bayley, 2006) ve sentetik por içeren katı membranlar (Branton ve ark., 2008) ve plastik membranlar (Harrell ve ark., 2006) geliştirilmiştir.

Nanopor teknolojisi hatalı nükleotit okuma oranının düşürülmesi, okunan dizi uzunluğunun artırılması, por

proteinin stabilitesinin uzun süre korunması açısından geliştirilmiştir. Akeson grubu, DNA polimerazı kullanarak DNA zinciri sentezlenirken DNA zincirini nanopordan her adımda tek nükleotidi geçmesini sağlamışlardır. Faj phi29 DNA polimeraz bu yaklaşım için uygundur çünkü uygulanan elektrik akımının baskısında DNaya bağlı kalabilmekte ve DNA'yı pora yönlendirmektedir (Lieberman ve ark., 2010). DNA polimeraz yaklaşık her on milisaniye veya daha kısa sürede bir nükleotid eklemektedir. Nanopora insert edilmiş DNA zincirinin hızı phi29 DNA polimeraz tarafından kontrol edilmektedir. Nanopor dizileme ile uzun zincir okumasının başarılması konvensiyonel kısa zincir okumaları ile karşılaştırıldığında teknolojik avantajlar sağlamaktadır. Uzun zincir okumaları, insersiyon delesyon ve gen tekrarları gibi kısa okumalar ile belirlenmesi zor olan dizilerin belirlenmesinde avantaj sağlamaktadırlar. Prensipte olarak Nanopor dizileme phi29 DNA polimeraz yaklaşımı ile sınırlandırılmış olsa da limitsiz dizileme sağlamaktadır. Diğer avantajı tek bir pordan pahalı floresan işaretli moleküller olmadan birden fazla dizileme yapılabilir.

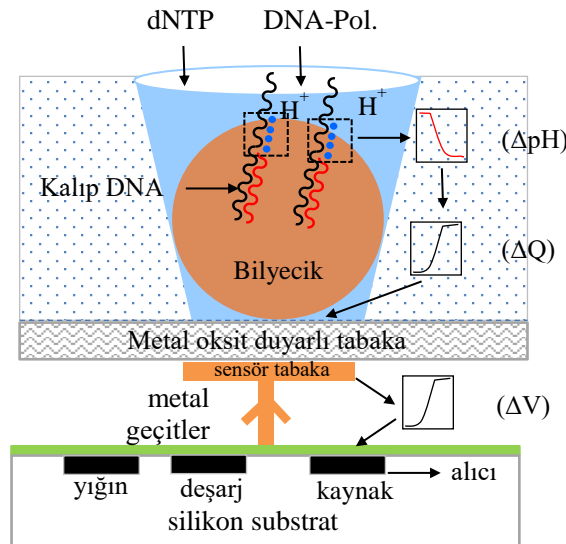
$\alpha$ -HL protein nanopor lipid tabakaya gömülme ve tabaka potasyum klorid solüsyonu içeren ortamı birbirinden ayırmaktadır. DNA zinciri por içerisine elektrik alan uygulayarak göndermektedir (Cherf ve ark., 2012). Por içerisinde aşağı veya yukarı hareket elektrik alan uygulaması ve polimeraz aktivitesi ile kontrol edilmektedir. (Manrao ve ark., 2012) DNA polimeraz ile nano por teknolojisini takip etmiş ancak  $\alpha$ -HL yerine geometrik olarak farklı mutant MspA proteini por olarak kullanmıştır. Nanopor dizileme kullanılarak 48,490 bç

uzunlukta lambda faj DNA genomu dizilenmiştir (Mikheyev ve Tin, 2014).

Alternatif bir yaklaşım katı hal nanoporlarının dizilemede kullanılmasıdır (Dekker, 2007). Katı hal nanoporları ayarlanabilir por büyüklüğü, biyolojik membranlardan daha dayanıklı olması ve temizlikten sonra tekrar kullanılabilir olması açısından avantaj sağlamaktadır. Silikon tabanlı konvensiyonel nano por membranlar yaklaşık 30 nm kalınlıkta ve 60 baz uzunluktaki tek zincir DNA'ya karşılık gelmektedir. Dolayısıyla bu membranların DNA dizileme için kullanım kolaylığı bulunmamakta ancak grafin gibi katı hal nano porları biofiziksel çalışmalar ilgi çekici alternatifler sunmaktadır. Grafin iletken karbon tabakası, kalınlığı sadece bir karbon atomu kadar olan ve ulaşılabilir en iyi nanopor membrandır.

### İyon Yarı İletken DNA Dizileme

İyon yarı iletken DNA dizileme metodu DNA zinciri polimerizasyonu esnasında açığa çıkan hidrojen iyonlarının belirlenmesi temeline dayanmaktadır. Metot kalıp DNA'nın karşı zinciri kopyalanırken eş zamanlı olarak dizileme yapmaktadır (Şekil 11). Dizilemede ilk adım, adaptor dizi içeren fragment DNA havuzunun yeterli sayıda oluşturulmasıdır. Bu işlem DNA fragmentlerine ligasyon ile adaptor dizilerin eklenmesi veya primer tasarlanır iken primerin 5' ucuna adaptor dizinin eklenmesi ile yapılabilir. Emülsiyon PCR ile çoğaltılan amplifikasyonlar çiplere uygulanmaktadır. Diğer metotlarda olduğu gibi dizilenecek fragmentin belli sayıda kopyasının olması nükleotid eklenmesi ile elde edilecek sinyalin daha net algılanmasına neden olacaktır.



Şekil 11. Rusk, (2011)'den uyarlanmış kalıp DNA fragmenti içeren yarı iletken dizileme kuyusunun ve sensörün şematik gösterimi. Nükleotidler sentezlenen DNA zincirine eklendiğinde protonlar ( $H^+$ ) açığa çıkmakta ve kuyunun pH'sı değişmektedir ( $\Delta pH$ ). Bu durum metal oksit duyarlı tabakanın yüzey potansiyel değişiminin uyaracak ve kaynak terminalin potansiyelini ( $\Delta pH$ ) değiştirecektir.

Sentezi primer tarafından başlatılmış uzayan DNA zincirine yeni nükleotidin (dNTP) eklenmesi ile oluşan kovalent bağ pirofosfat ve pozitif yüklü hidrojeni açığa çıkarmaktadır (Purushothaman ve ark., 2006; Rusk, 2011). İyon yarı iletken dizileme nükleotid eklenmesi ile açığa çıkan hidrojenin kimyasal olarak belirlenmesi temeline dayanmaktadır (Şekil 11). Uzayan DNA zincirine dört farklı nükleotid sıra ile döngüsel olarak eklenmektedir. dNTP'ler, yarı iletken çip üzerindeki mikro kuyucuklarda bulunan dizilenecek kalıp DNA'nın çok sayıdaki tek zincir kopyası ve DNA polimeraz bulunan reaksiyonlara sıra ile eklenmektedir (Pennisi, 2010; Perkel, 2011; Rusk, 2011). dNTP eşlenmemiş kalıp DNA zincirine eklendiğinde, yeni sentezlenen zincir DNA polimeraz ile uzatılır. Eklenen nükleotid zincire bağlandığında açığa çıkacak hidrojen iyonu açığa çıkacak reaksiyon solüsyonunun pH'sını değiştirerek ve bu değişim ISFET (ion-sensitive field effect transistor) tarafından algılanacaktır (Pennisi, 2010; Rusk, 2011). Eşleşmemiş dNTP molekülleri bir sonraki döngü başlamadan önce reaksiyondan uzaklaştırılacaktır. Eklenen dNTP uzayan zincirin kalıp DNA'daki karşılığı değil ise nükleotid eklenmeyecek ve biyokimyasal reaksiyon gerçekleşmediğinden pH değişimi olmayacaktır.

Yeterli miktarda amplifiye edilmiş DNA fragmentlerinin bulunduğu mikro kuyucuğun altında, iyon hassas tabakası ve bunun altında ISFET iyon sensörü bulunmaktadır. Bütün tabakalar yarı iletken çip ile bağlanmaktadır (Şekil 9). Her bir çip, mikrokuyucukların ISFET algılanan sonuçlarını göstermektedir. Salınan her bir hidrojen iyonu iyon sensörü tarafından algılanmaktadır. Çipten alınan elektrik sinyalleri bilgisayara aktarılmakta ve DNA dizisine işlenmektedir (Pennisi, 2010). Sinyal işleme ve DNA birleştirilmesi software tarafından yapılmaktadır.

Teknik, hızlı, düşük kurulum ve işletim masrafı, modifiye nükleotid kullanılmaması ve optik okumanın

kullanılmaması gibi güçlü yönlere sahiptir. Dizileme sistemi doğal DNA polimeraz enzimi kullanmakta ve dizileme eş zamanlı olarak belirlenmektedir. Yarı iletken dizileme sistemi 4 saniyede bir nükleotid ekleyebildiği ve 100-200 nükleotidi yaklaşık bir saat sürede tamamlanabileceği bildirilmektedir. Tekniğin tekrar nükleotidleri belirlemede sınırlamaları bulunmakta ve Sanger dizileme metoduna göre daha kısa yaklaşık 400 nükleotidi nükleotid okuması yapılmaktadır. Teknoloji DNA elektronik Ltd. tarafından lisanslandırılmış, Ion Torrent Inc. tarafından geliştirilmiş ve 2010 yılında yayınlanmıştır (Rusk, 2011).

## SONUÇ

Farklı dizileme konsorsiyumlarının geliştirdikleri yeni nesil dizileme teknolojileri son yıllarda ön olana çıkmış ve güvenilirliği yüksek olan çok sayıda nükleotid dizi verileri oluşturulmuştur. Yeni nesil dizileme yaklaşımları ile dizileme maliyeti düşmüş ve sadece belli genom merkezlerinin erişebildiği ve üretebildiği nükleotid verilerine erişim kolaylaşmıştır. Yeni moleküler veri üretebilen ve bunları yaygınlaştıran araştırma grup sayısı artmıştır. Farklı deneysel sonuçların birleştirilmesi, genom düzeyinde metilasyon, histon bağlanma ve gen ekspresyonlarının desenlerinin analiz edilmesi mümkün olmuştur. Yeniden yapılmış nükleotid dizileri, kompleks genomlardaki varyasyon, klinik patojen mikroorganizma ve virüs genomlarının karakterize edilmesine yardımcı olmuştur. Günümüzde genom dizileri yayınlanmakta ancak uygulanabilir sonuçlar ile ilişkilendirilmede sınırlamalar bulunmaktadır. Yakın bir gelecekte genomik DNA bilgileri biyoloji ve tıbbi alanlara transfer edilerek hastalıkların sebepleri, tanısı, yeni ilaçların gelişimine ve mikroarray teknolojisi ile birleştirilerek uygulanabilir nitelikte yaklaşımları açığa çıkarılabilecektir.

## KAYNAKLAR

- Akeson M, Branton D, Kasianowicz JJ, Brandin E, Deamer DW 1999. Microsecond Time-Scale Discrimination Among Polycytidylic Acid, Polyadenylic Acid, and Polyuridylic Acid As Homopolymers or As Segments Within Single RNA Molecules. *Biophys J*, 77(6):3227-3233.
- Ansorge WJ, 2009. Next-Generation DNA Sequencing Techniques. *New Biotechnol*, 25(4):195-203.
- Ansorge W, Sproat B, Stegemann J, Schwager C, Zenke M 1987. Automated DNA Sequencing - Ultrasensitive Detection of Fluorescent Bands during Electrophoresis. *Nucleic Acids Res*, 15(11):4593-4602.
- Bayley H, 2006. Sequencing Single Molecules Of DNA. *Curr Opin Chem Biol*, 10(6):628-637.
- Bentley DR 2006. Whole-Genome Re-Sequencing. *Curr Opin Genet Dev*, 16(6):545-552.
- Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, Smith ... , A.J. Smith. 2008. Accurate Whole Human Genome Sequencing Using Reversible Terminator Chemistry. *Nature*, 456(7218):53-59.
- Bhakdi S, Tranumjensen J 1991. Alpha-Toxin of *Staphylococcus-Aureus*. *Microbiol Rev*, 55(4):733-751.
- Bowers J, Mitchell J, Beer E, Buzby, PR, Causey ..., Thompson, JF.2009. Virtual Terminator Nucleotides For Next-Generation DNA Sequencing. *Nat Methods*, 6(8):593-U560.
- Branton D, Deamer DW, Marziali, A. ..., Schloss JA 2008. The Potential and Challenges Of Nanopore Sequencing. *Nat Biotechnol*, 26(10):1146-1153.
- Chen F, Gaucher EA, Leal NA, Hutter D, Havemann SA, Govindarajan S, Ortlund EA, Benner SA 2010. Reconstructed Evolutionary Adaptive Paths Give Polymerases Accepting Reversible Terminators For Sequencing and SNP Detection. *P Natl Acad Sci*, 107(5):1948-1953.
- Cherf GM, Lieberman KR, Rashid H, Lam CE, Karplus K, Akeson M 2012. Automated Forward And Reverse

- Ratcheting Of DNA In A Nanopore At 5-Angstrom Precision. *Nat Biotechnol*, 30(4):344-348.
- Deamer DW, Branton D 2002. Characterization of Nucleic Acids by Nanopore Analysis. *Accounts Chem Ref*, 35(10):817-825.
- Dekker C 2007. Solid-State Nanopores. *Nat Nanotechnol*, 2(4):209-215.
- Edwards A, Voss HP, Rice A, Civitello J, Stegemann C, Schwager J, Zimmermann H, Erfle C, Caskey T, Ansorge W 1990. Automated DNA Sequencing of the Human Hprt Locus. *Genomics*, 6(4):593-608.
- Eriksson J, Gharizadeh B, Nordstrom T, Nyren P 2004a. Pyrosequencing (TM) Technology at Elevated Temperature. *Electrophoresis*, 25(1):20-27.
- Eriksson J, Gharizadeh B, Nourizad N, Nyren P 2004b. 7-Deaza-2'-Deoxyadenosine-5'-Triphosphate as An Alternative Nucleotide for The Pyrosequencing Technology. *Nucleos Nucleot Nucl*, 23(10):1583-1594.
- Eriksson J, Nordstrom T, Nyren P 2003. Method Enabling Firefly Luciferase-Based Bioluminometric Assays at Elevated Temperatures. *Anal Biochem*, 314(1):158-161.
- Fields S 2007. Site-seeing by Sequencing. *Science*, 316(5830):1441-1442.
- Fuller CW, Middendorf LR, Benner SA, Church GM, Harris T, Huang XH, Jovanovich SB, Nelson JR, Schloss JA, Schwartz DC, Vezenov DV 2009. The Challenges of Sequencing by Synthesis. *Nat Biotechnol*, 27(11):1013-1023.
- Gardner AF, Wang JC, Wu, WD, Karouby J, Li H, Stupi BP, Jack WE, Hersh MN, Metzker ML 2012. Rapid Incorporation Kinetics and Improved Fidelity Of A Novel Class Of 3'-OH Unblocked Reversible Terminators. *Nucleic Acids Res*, 40(15):7404-7415.
- Gharizadeh B, Ghaderi M, Donnelly D, Amini B, Wallin KL, Nyren P 2003a. Multiple-Primer DNA Sequencing Method. *Electrophoresis*, 24(7-8):1145-1151.
- Gharizadeh B, Ohlin A, Molling P, Backman A, Amini B, Olcen P, Nyren P 2003b. Multiple Group-Specific Sequencing Primers For Reliable and Rapid DNA Sequencing. *Molecular and Cellular Probes*, 17(4):203-210.
- Gharizadeh B, Eriksson J, Nourizad N, Nordstrom T, Nyren P 2004. Improvements in Pyrosequencing Technology by Employing Sequenase Polymerase. *Anal Biochem*, 330(2):272-280.
- Gharizadeh B, Oggionni M, Zheng B, Akom E, Pourmand N, Ahmadian A, Wallin KL, Nyren P 2005. Type-Specific Multiple Sequencing Primers: A Novel Strategy For Reliable And Rapid Genotyping Of Human Papillomaviruses By Pyrosequencing Technology. *J Mol Diagn*, 7(2):198-205.
- Gharizadeh B, Nordstrom T, Ahmadian A, Ronaghi M, Nyren P 2002. Long-Read Pyrosequencing Using Pure 2'-Deoxyadenosine-5'-O'-(1-Thiotriphosphate) Sp-Isomer. *Anal Biochem*, 301(1):82-90.
- Guo J, Yu L, Turro NJ, Ju JY 2010. An Integrated System for DNA Sequencing by Synthesis Using Novel Nucleotide Analogues. *Accounts Chem Res*, 43(4):551-563.
- Guo J, Xu N, Li ZM, Zhang SL, Wu J, Kim DH, Marma MS, Meng QL, Cao HY, Li XX, Shi SD, Yu L, Kalachikov S, Russo JJ, Turro NJ, Ju, JY 2008. Four-Color DNA Sequencing With 3'-O-Modified Nucleotide Reversible Terminators and Chemically Cleavable Fluorescent Dideoxynucleotides. *P Natl Acad Sci, USA* 105(27):9145-9150.
- Harrell CC, Choi Y, Horne LP, Baker LA, Siwy ZS, Martin CR 2006. Resistive-Pulse DNA Detection With A Conical Nanopore Sensor. *Langmuir*, 22(25):10837-10843.
- Healy K 2007. Nanopore-Based Single-Molecule DNA Analysis. *Nanomedicine*, 2(4):459-481.
- Hutter D, Kim MJ, Karalkar N, Leal NA, Chen F, Guggenheim E, Visalakshi V, Olejnik J, Gordon S, Benner SA 2010. Labeled Nucleoside Triphosphates with Reversibly Terminating Aminoalkoxyl Groups. *Nucleos Nucleot Nucl*, 29(11-12):879-895.
- Karamohamed S, Nyren P 1999. Real-time Detection And Quantification of Adenosine Triphosphate Sulfurylase Activity by A Bioluminometric Approach. *Anal Biochem.*, 271(1):81-85.
- Kasianowicz JJ, Brandin E, Branton D, Deamer DW 1996. Characterization of Individual Polynucleotide Molecules Using A Membrane Channel. *P Natl Acad Sci*, 93(24):13770-13773.
- Li ZM, Bai XP, Ruparel H, Kim S, Turro NJ, Ju JY 2003. A Photocleavable Fluorescent Nucleotide For DNA Sequencing and Analysis. *P Natl Acad Sci, USA*, 100(2):414-419.
- Lieberman KR, Cherf GM, Doody MJ, Olasagasti F, Kolodji Y, Akeson M 2010. Processive Replication of Single DNA Molecules in a Nanopore Catalyzed by phi29 DNA Polymerase. *J Am Chem Soc*, 132(50):17961-17972.
- Litosh VA, Wu WD, Stupi BP, Wang JC, Morris SE, Hersh MN, Metzker ML 2011. Improved Nucleotide Selectivity And Termination Of 3'-OH Unblocked Reversible Terminators By Molecular Tuning Of 2-Nitrobenzyl Alkylated Homeddu Triphosphates. *Nucleic Acids Res*, 39(6): 1-13.
- Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He, Y, Pong R, Lin DN, Lu LH, Law M 2012. Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. *J Biomed Biotechnol*, 2012 (2012): 1-11.
- Manrao EA, Derrington IM, Laszlo AH, Langford KW, Hopper MK, Gillgren N, Pavlenok M, Niederweis M, Gundlach JH 2012. Reading DNA At Single-Nucleotide Resolution With a Mutant Mspa Nanopore and Phi29 DNA Polymerase. *Nat Biotechnol*, 30(4):349-353.
- Mardis ER 2008. Next-Generation DNA Aequencing methods. *Annu. Rev. Genom. Human Genet*, 9: 387-402.

- Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, ... & Dewell, SB 2005. Genome Sequencing in Microfabricated High-Density Picolitre Reactors. *Nature*, 437(7057) 376-380.
- Meller A, Nivon L, Branton D 2001. Voltage-Driven DNA Translocations Through A Nanopore. *Phys Rev Lett*, 86(15):3435-3438.
- Meller A, Nivon L, Brandin E, Golovchenko J, Branton D 2000. Rapid Nanopore Discrimination Between Single Polynucleotide Molecules. *P Natl Acad Sc, USA*, 97(3):1079-1084.
- Metzker ML 2010. Applications of Next-Generation Sequencing Technologies - The Next Generation. *Nat Rev Genet*, 11(1):31-46.
- Mikheyev AS, Tin MMY 2014. A First Look At The Oxford Nanopore Minion Sequencer. *Mol Ecol Resour*, 14(6):1097-1102.
- Nakane JJ, Akeson M, Marziali A 2003. Nanopore Sensors For Nucleic Acid Analysis. *J Phys-Condens Mat*, 15(32): 1365-1393.
- Nordstrom T, Alderborn A, Nyren P 2002. Method For One-Step Preparation of Double-Stranded DNA Template Applicable For Use With Pyrosequencing (TM) Technology. *J Biochem Bioph Meth*, 52(2):71-82.
- Nyren P 1994. Apyrase Immobilized On Paramagnetic Beads Used To Improve Detection Limits In Bioluminometric Atp Monitoring. *J Biolum Chemilum*, 9(1):29-34.
- Pennisi E 2010. Genomics Semiconductors Inspire New Sequencing Technologies. *Science*, 327(5970):1190-1190.
- Perkel J 2011. Making Contact with Sequencing's Fourth Generation. *Biotechniques*, 50(2):93-95.
- Purushothaman S, Toumazou C, Ou CP 2006. Protons and Single Nucleotide Polymorphism Detection: A Simple Use for The Ion Sensitive Field Effect Transistor. *Sensor Actuat B-Chem*, 114(2):964-968.
- Ronaghi M 2000. Improved Performance of Pyrosequencing Using Single-Stranded DNA-Binding Protein. *Anal Biochem*, 286(2):282-288.
- Ronaghi M, Uhlen M, Nyren P 1998. A Sequencing Method Based on Real-Time Pyrophosphate. *Science*, 281(5375):363-365.
- Ronaghi M, Karamohamed S, Pettersson B, Uhlen M, Nyren P 1996. Real-Time DNA Sequencing Using Detection of Pyrophosphate Release. *Anal Biochem*, 242(1):84-89.
- Rusk N 2011. Torrents of Sequence. *Nat Methods*, 8(1):44-44.
- Shendure J, Ji HL 2008. Next-Generation DNA Sequencing. *Nat Biotechnol*, 26(10):1135-1145.
- Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RJ, Hughes P, Dodd C, Connell CR, Heiner C, Kent SBH, Hood LE 1986. Fluorescence Detection in Automated DNA-Sequence Analysis *Nature*, 321(6071):674-679.
- Wu W, Stupi BP, Litosh VA, Mansouri D, Farley D, Morris S, Metzker S, Metzker ML 2007. Termination of DNA Synthesis by N-6-Alkylated, Not 3-O-Alkylated, Photocleavable 2-Deoxyadenosine Triphosphates. *Nucleic Acids Res*, 35(19):6339-6349.