



ΑΛΕΞΑΝΔΡΕΙΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ

ΙΔΡΥΜΑ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ

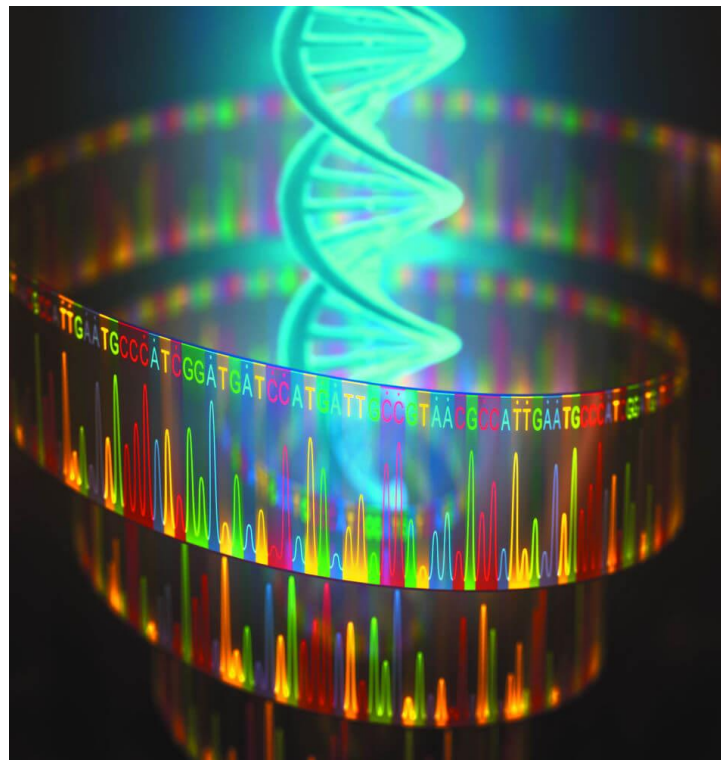
ΣΧΟΛΗ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ

Πτυχιακή Εργασία της

Γεωργία Σακκά



Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Ανδρονίκη Παπουτσή,
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας και Γενετικής

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2018

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την καθηγήτρια και επιβλέπουσα της πτυχιακής μου εργασίας κ. Ανδρονίκη Παπουτσή, κυρίως για την κατανόηση, την υπομονή και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθ' όλη την διάρκεια εκπόνησης της εργασίας μου. Η καθοδήγησής και η βοήθεια της ήταν πολύτιμη.

Επιπλέον, δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω την οικογένεια μου για όλη την στήριξη που μου παρείχαν σε όλη την διάρκεια των προπτυχιακών σπουδών μου, φροντίζοντας έτσι για την καλύτερη δυνατή μόρφωσή μου.

Γεωργία Σακκά

Περιεχόμενα

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	4
1. ΙΣΤΟΡΙΑ SEQUENCING	5
1.1 Αλληλούχιση 1 ^{ης} Γενιάς.....	5
1.2 Αλληλούχιση 2 ^{ης} Γενιάς.....	7
1.3 Αλληλούχιση 3 ^{ης} Γενιάς.....	8
2. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ 1 ^{ΗΣ} ΓΕΝΙΑΣ.....	10
2.1 Τεχνική «Προσθήκης και Αφαίρεσης».....	10
2.2 Χημική Διάσπαση - Chemical Cleavage.....	12
2.3 Μέθοδος Τερματισμού Αλυσίδας ή Διδεοξυ-Νουκλεοτιδική Μέθοδος	13
2.3.1 Βιομηχανοποίηση της Τεχνικής “Sanger”	16
3. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ 2 ^{ΗΣ} ΓΕΝΙΑΣ.....	21
3.1 Αλληλούχιση με Υβριδοποίηση	21
3.1 Pyrosequencing.....	22
3.1.1 Βιομηχανοποίηση της Τεχνικής Pyrosequencing.....	25
3.1.2 Solexa / Illumina Sequencing	28
3.2 Αλληλούχιση με Σύνδεση Ολιγονουκλεοτιδίων και Ανίχνευση (SOLiD).....	32
4. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ 3 ^{ΗΣ} / ΝΕΑΣ ΓΕΝΙΑΣ.....	37
4.1 Αλληλούχιση Μεμονωμένου Μορίου με Εξωνουκλεάση	37
4.2 Αλληλούχιση Μεμονωμένου Μορίου σε Πραγματικό Χρόνο	40
4.3 DNA Nanoball Sequencing	43
4.4 Ion torrent.....	47
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	55
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	57
ABSTRACT	58
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	59

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Μετά την ανακάλυψη της διπλής έλικας του DNA το 1953 από τους James D. Watson και Francis Crick, το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας εστιάστηκε στην ανάλυση των βιομορίων DNA και RNA, στοχεύοντας στα νουκλεοτίδια. Έγιναν πολλές έρευνες για την ανάλυση των νουκλεοτιδίων και την εξακρίβωση των επιμέρους στοιχείων τους.

Η παρατήρηση πως η διαδοχική σειρά των νουκλεοτιδίων στην πολυνουκλεοτιδική αλυσίδα είναι εξίσου σημαντική και μπορεί να διαλευκάνει πολλά ερωτήματα της επίγειας ζωής άλλαξε την πορεία των ερευνητών. Έτσι λοιπόν, περίπου 50 χρόνια πριν ξεκίνησαν οι έρευνες και οι απόπειρες εξακρίβωσης της νουκλεοτιδικής σειράς στο DNA και RNA.

Η παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματεύεται την ιστορία της τεχνολογίας αλληλούχισης βιομορίων και αναλύει διαδοχικά τις επιμέρους τεχνικές για την πραγματοποίησή της. Σκοπός αυτής της εργασίας είναι η αναφορά των σημείων σταθμών στην ιστορία της αλληλούχισης βιομορίων καθώς και η καταγραφή των μεθόδων βήμα προς βήμα με απώτερο σκοπό την όσο δυνατή καλύτερη απεικόνιση της εξέλιξης των τεχνολογιών αλληλούχισης.

1. ΙΣΤΟΡΙΑ SEQUENCING

Η σειρά των νουκλεοτιδίων σε μία πολυνουκλεοτιδική αλυσίδα περιέχει πληροφορίες τόσο για τις κληρονομικές όσο και για τις βιοχημικές ιδιότητες της επίγειας ζωής. Έτσι λοιπόν, η δημιουργία τεχνικής για τον καθορισμό της σειράς νουκλεοτιδίων σε μόρια DNA ή RNA ήταν επιτακτική ανάγκη για τη διεξαγωγή βιολογικών ερευνών. Τα τελευταία 50 χρόνια γίνεται μεγάλη προσπάθεια για την πραγμάτωση και την εξέλιξη της τεχνολογίας αλληλούχισης πολυνουκλεοτιδικών αλυσίδων – **Τεχνολογία Sequencing** [1]. Οι πρώτες απόπειρες αλληλούχισης μορίων χαρακτηρίστηκαν ως "Αλληλούχιση 1^{ης} γενιάς" -1st Generation Sequencing, στην συνέχεια έκαναν την εμφάνισή τους τεχνικές 2^{ης} Γενιάς -2nd Generation Sequencing- και τέλος 3^{ης} ή «Επόμενης Γενιάς»- Next Generation Sequencing οι οποίες σήμερα χαρακτηρίζονται από τη δυνατότητα μαζικής αλληλούχισης, υψηλής ταχύτητας αλλά κυρίως από χαμηλό κόστος [2].

1.1 Αλληλούχιση 1^{ης} Γενιάς

Αρχικά, η προσπάθεια για αλληλούχιση επικεντρώθηκε στους εύκολους στόχους των βιολογικών ερευνών, όπως είναι τα διάφορα είδη των πληθυσμών RNA - μικροβιακό ριβοσωμικό, μεταφορικό RNA καθώς επίσης και τα γονιδιώματα των μονόκλωνων RNA βακτηριοφάγων. Παρόλα τα πλεονεκτήματα των βιομορίων αυτών δεν σημειώθηκε καμία εξέλιξη στην τεχνική αλληλούχισης, καθώς μέχρι τότε υπήρχε δυνατότητα μόνο για ανάλυση της σύνθεσης των νουκλεϊκών οξέων και όχι ανάλυση της αλληλουχίας των βάσεων [3]. Ήταν το 1965, όταν ο Robert Holley και οι συνεργάτες του κατάφεραν να αλληλουχίσουν ένα ολόκληρο νουκλεϊκό οξύ, και συγκεκριμένα το tRNA από το *Saccharomyces cerevisiae* [4]. Παράλληλα ο Fred Sanger και οι συνεργάτες του ανέπτυξαν μια τεχνική βασισμένη στην ανίχνευση ραδιοσημασμένων θραυσμάτων μερικής αποδόμησης μετά από κλασματοποίηση 2 διαστάσεων [5]. Χρησιμοποιώντας αυτήν την τεχνική το εργαστήριο του Walter Fiers κατάφερε 7 χρόνια μετά (1972) να συνθέσει την 1^η ολοκληρωμένη αλληλουχία γονιδίου από τον *βακτηριοφάγο MS2* [6].

Μετά τα παραπάνω επιτεύγματα, δημιουργήθηκε η ανάγκη στους ερευνητές για περαιτέρω εξέλιξη της αλληλούχισης βιομορίων. Έτσι λοιπόν, ξεκίνησε η χρήση βακτηριοφάγων με DNA γονιδίωμα, έχοντας στόχο τη δημιουργία καινούργιων πρωτοκόλλων .

Οι Ray Wu και Dale Kaiser χρησιμοποίησαν το πλεονέκτημα των «συνεκτικών άκρων» του *λ βακτηριοφάγου* και κατάφεραν προσθέτοντας ένα προς ένα ραδιενεργά νουκλεοτίδια στο τέλος των άκρων να συνθέσουν την αλληλουχία, χρησιμοποιώντας DNA πολυμεράση [7,8]. Η τεχνική ενσωμάτωσης των ραδιενεργών νουκλεοτιδίων γενικεύτηκε έτσι ώστε να συνταχθεί η σειρά των νουκλεοτιδίων οπουδήποτε, όχι μόνο στο τέλος του γονιδιώματος του βακτηριοφάγου. Ωστόσο, ο πραγματικός προσδιορισμός των βάσεων εξακολουθούσε να περιορίζεται σε γονιδίωμα μικρής έκτασης νουκλεοτιδίων και να περιλαμβάνει σε μεγάλο βαθμό τεχνικές αναλυτικής χημείας και διαδικασιών κλασμάτωσης [9-11].

Η επόμενη μεγάλη πρακτική αλλαγή έγινε στα μέσα του 1970 και έμελλε να θέσει τις βάσεις για την δημιουργία δύο καινοτόμων μεθόδων για την εποχή. Όλα ξεκίνησαν όταν η κλασματοποίηση δύο διαστάσεων (στην πρώιμη τεχνική του Sanger) αντικαταστάθηκε από την απλή μέθοδο ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου, η οποία προάγει τον διαχωρισμό των θραυσμάτων των πολυνουκλεοτιδικών αλυσίδων με βάση το μέγεθός τους. Έτσι το 1975 δημοσιεύτηκε η τεχνική «Προσθήκης και Αφαίρεσης» -“Plus and Minus”- των Alan Coulson και Fred Sanger και το 1977 η τεχνική «Χημικής Διάσπασης» από τους Allan Maxam και Walter Gilbert [11,12]. Με την πρώτη τεχνική, ο Sanger και οι συνεργάτες του κατάφεραν να αλληλουχίσουν το πρώτο γονιδίωμα DNA, από τον βακτηριοφάγο *φX174* ο οποίος σήμερα χρησιμοποιείται σε εργαστήρια αλληλούχισης ως θετικός μάρτυρας. Κατά τη χημική διάσπαση γίνεται επεξεργασία ραδιοσημασμένου και χημικά επεξεργασμένου DNA με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου. Η τεχνική αυτή αφομοιώθηκε σε μεγάλο βαθμό. Το στάδιο αυτό της έρευνας χαρακτηρίστηκε από πολλούς ως την έναρξη για την Αλληλούχιση ^{1^{ns}} Γενιάς.

Η τεχνική όμως που άλλαξε για πάντα την ιστορία στην αλληλούχιση βιομορίων δημιουργήθηκε το 1977 από τον Sanger και τους συνεργάτες του. Η μέθοδος αυτή χαρακτηρίζεται ως «Μέθοδος Τερματισμού Αλυσίδας» -“Chain Terminator Method”- ή τεχνική «Διδοξυνουκλεοτιδίου», αλλά μέχρι και σήμερα είναι ευρέως γνωστή ως «Τεχνική Sanger» [14]. Εδώ, για πρώτη φορά, χρησιμοποιήθηκαν χημικά ανάλογα των δεοξυνουκλεοτιδίων τα οποία είναι μονομερή των DNA κλώνων [15].

Καθώς η τεχνική αυτή χαρακτηρίζεται από απλότητα και ακρίβεια στο αποτέλεσμα της, έγινε πολύ γρήγορα κυρίαρχη στην αλληλούχιση βιομορίων. Με την αυτοματοποίησή της έγινε δυνατή η αλληλούχιση του πρώτου ανθρώπινου μιτοχονδριακού γονιδίου [16] , του πρώτου βακτηριακού γονιδίου (*Haemophilus Influenzae*) [17], του πρώτου ευκαρυωτικού γονιδίου (*Saccharomyces Cerevisiae*) [18] , του πρώτου πολυκύτταρου ζωικού γονιδίου (*Caenorhabditis Elegans*) [19], του φυτικού γονιδίου (*Arabidopsis Thaliana*) [20], και τέλος της *Drosophila Melanogaster* [21,22] αλλά και φυσικά για πρώτη φορά του ανθρώπινου γονιδίου [22-26]. Με βάση τα παραπάνω μπορεί να γίνει αντιληπτό το μέγεθος της εξέλιξης αυτής της τεχνικής. Αξίζει να σημειωθεί ότι η μέθοδος Sanger χρησιμοποιείται μέχρι και σήμερα σε αρκετά εργαστήρια.

1.2 Αλληλούχιση 2^{ης} Γενιάς

Η τεχνική «Μικτών Γενεών» όπως χαρακτηρίζεται ,καθώς ενώνει τις δύο τάξεις γενεών αλληλούχισης, δημιουργήθηκε από μια ομάδα Σέρβων επιστημόνων στις αρχές του 1990 [27,28]. Η καινοτομία στην μέθοδο αυτή ήταν ότι πρόσθεσαν μικρού μεγέθους νουκλεοτίδια (5-25 bp) υβριδίζοντάς τα στην πολυνουκλεοτιδική αλυσίδα της οποίας την αλληλουχία αναζητούσαν [29]. Παρόλο που φαινόταν να υπάρχει προοπτική στην εξέλιξη της μεθόδου, η εφαρμογή της σε μεγαλύτερου μεγέθους μόρια παρουσίαζε επιπλοκές [30].

Οι επιστήμονες λοιπόν, αλλάζουν εντελώς πορεία στις έρευνές τους. Στην δεύτερη γενιά αλληλούχισης βλέπουμε τεχνικές στις οποίες απουσιάζουν η προσθήκη ραδιοσημασμένου νουκλεοτιδίου ή η χρήση διδεοξυνουκλεοτιδίου ή ακόμα και η ανάλυση με τη μέθοδο ηλεκτροφόρησης [31]. Το βασικό χαρακτηριστικό των μεθοδολογιών της δεύτερης γενιάς είναι ότι πραγματοποιούνται πολλές αντιδράσεις αλληλούχισης ταυτόχρονα. Σε αυτό βοήθησε ότι πλέον μπορούσαν να αποκωδικοποιήσουν όλες τις αντιδράσεις που γίνονται κατά την αλληλούχιση καθώς και το γεγονός ότι τα μηχανήματα και οι τεχνικές που χρησιμοποιούσαν είχαν εξελιχθεί πολύ σε σχέση με την 1^η γενιά. Παρατηρείται σημαντική μείωση στο χρόνο αλλά και στο κόστος των διαφόρων μεθόδων σε σχέση με τη ποσότητα του DNA που δύναται να αλληλουχηθεί [32].

Η μέθοδος που ξεχώρισε την περίοδο αυτή ακούει στο όνομα *Pyrosequencing* ή αλλιώς *454 Αλληλούχιση*. Η τεχνική *pyrosequencing* βασίζεται στην ανίχνευση φωτεινού σήματος κατά την ενσωμάτωση νουκλεοτιδίου με την DNA πολυμεράση [32] και πρωτοστάτης σε αυτή υπήρξε ο Pål Nyren. Σε σχέση με τις προηγούμενες τεχνικές, εδώ χρησιμοποιούνται φυσικά νουκλεοτίδια και όχι «βαριά» τροποποιημένα dNTPs, και η παρατήρηση του φαινομένου γίνεται σε φυσικό χρόνο χωρίς να απαιτείται χρονοβόρα ηλεκτροφόρηση [33-35]. Στην συνέχεια αναπτύχθηκαν διάφορες συμπληρωματικές μέθοδοι, πιο σημαντική από τις οποίες αναδείχτηκε η μέθοδος αλληλουχίας *Solexa* ή αλλιώς *Illumina* (όνομα από την εταιρεία που την υιοθέτησε). Με την τεχνική *Solexa* έχουμε την αλληλούχιση μεγαλύτερου όγκου δεδομένων. Πλέον «διαβάζονται» ταυτόχρονα έως και 100bp πολλαπλών μορίων, κι έτσι μέσα σε έντεκα μέρες το μηχάνημα αυτό συνθέτει έως και 600Gbp.

1.3 Αλληλούχιση 3^{ης} Γενιάς

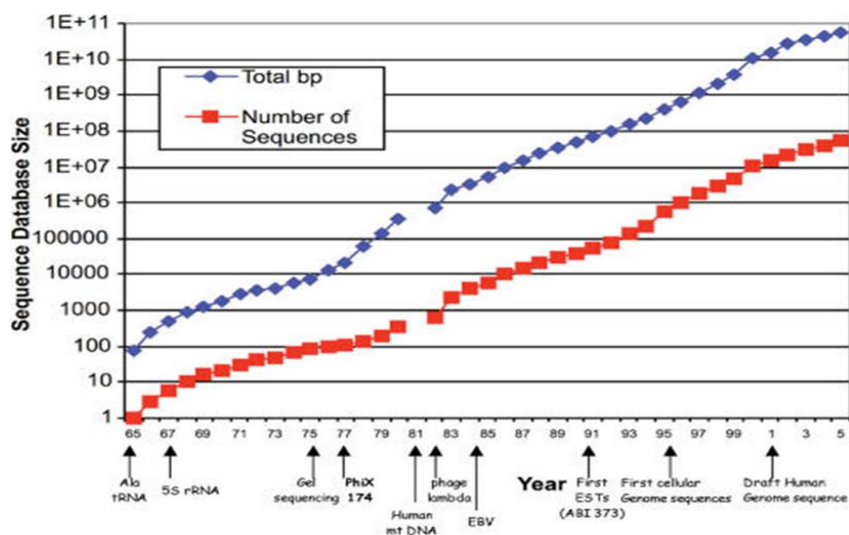
Οι τεχνικές αλληλούχισης 3^{ης} ή Νέας Γενιάς ξεχωρίζουν καθώς επικεντρώνονται σε ένα σκοπό: την μείωση του κόστους και του χρόνου της διαδικασίας. Με την αλληλούχιση μεμονωμένων μορίων επιτυγχάνεται η μειωμένη χρήση αντιδραστηρίων και φυσικά δεν χρειάζεται χρόνος για την προετοιμασία και την ενίσχυση των δειγμάτων [38,39].

Η Αλληλούχιση Μεμονωμένου Μορίου –*Single Molecule Sequencing*- είναι κύρια τεχνική της νέας γενιάς. Βασίζεται σε τεχνολογία λέιζερ και επιτρέπει την ταχεία ανάλυση αλληλουχίας DNA θραυσμάτων 40 kb ή μεγαλύτερα με ρυθμό 100-1000 βάσεων ανά δευτερόλεπτο [40]. Πρώτη φορά αναπτύχθηκε στο εργαστήριο του Stephen Quake [41,42] και αργότερα εμπορευματοποιήθηκε από την *Helicos BioSciences*. Ενώ ήταν σχετικά αργή και ακριβή, με παραγωγή μικρών ποσοτήτων προϊόντων αλληλούχισης, ήταν η πρώτη τεχνική που δεν συμπεριλάμβανε χημική ενίσχυση του DNA και έτσι αποφεύχθηκαν οι μεροληψίες και τα σφάλματα κατά την διαδικασία [43,44]. Η εταιρεία *Helicos BioSciences* χρεοκόπησε το 2012 [45] και έτσι άλλες εταιρείες πήραν τα δικαιώματα της μεθόδου.

Εξέλιξη της παραπάνω τεχνικής είναι η *Αλληλούχιση Μεμονωμένου Μορίου σε Πραγματικό Χρόνο- Real Time Single Molecule Sequencing*.

Με την μέθοδο αυτή είναι εφικτή η αλληλούχιση μεμονωμένου μορίου σε πολύ λίγο χρόνο [46]. Άλλες τεχνικές όπως *DNA Nanoball Sequencing* κατάφεραν την αλληλούχιση μορίων με υψηλό βαθμό συστοιχιών. Η συγκεκριμένη χρησιμοποιήθηκε για την αλληλούχιση του ανθρώπινου γονιδιώματος με κόστος περίπου 5000 δολαρίων [47]. Ακόμα νεότερες τεχνολογίες είναι η *Αλληλούχιση Nanopore* καθώς και η *IonTorrent*. Η πρώτη εκμεταλλεύεται τις ιδιότητες αγωγιμότητας των πουρινών [48] ενώ η δεύτερη θυμίζει την μεθοδολογία της 454 αλληλούχισης με τη διαφορά του πολύ χαμηλότερου κόστους [49].

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι οι τεχνολογίες της νέας γενιάς αλληλούχισης είναι ένα φαινόμενο των τελευταίων 5 χρόνων που εξελίσσεται με ταχύτερους ρυθμούς. Μέσα σε 30 χρόνια η τεχνολογία αλληλούχισης έχει κάνει τεράστια πρόοδο τόσο στην ταχύτητα όσο και στα μεγέθη γονιδιωμάτων που αναλύονται. Από το πρώτο μικρό γονιδίωμα φάγων, 5386 βάσεων σε μήκος, η αλληλούχιση του DNA προχώρησε στην αλληλουχία του ανθρώπινου γονιδιώματος με ~ 3 δισεκατομμύρια βάσεις. Είναι αξιοσημείωτο ότι αυτή η πρόοδος έχει σημειωθεί χρησιμοποιώντας μεθόδους που είναι βελτιώσεις της βασικής μεθόδου «διδοξύ» που εισήγαγε ο Sanger το 1977. [50] *Βλέπε Εικ. 1*



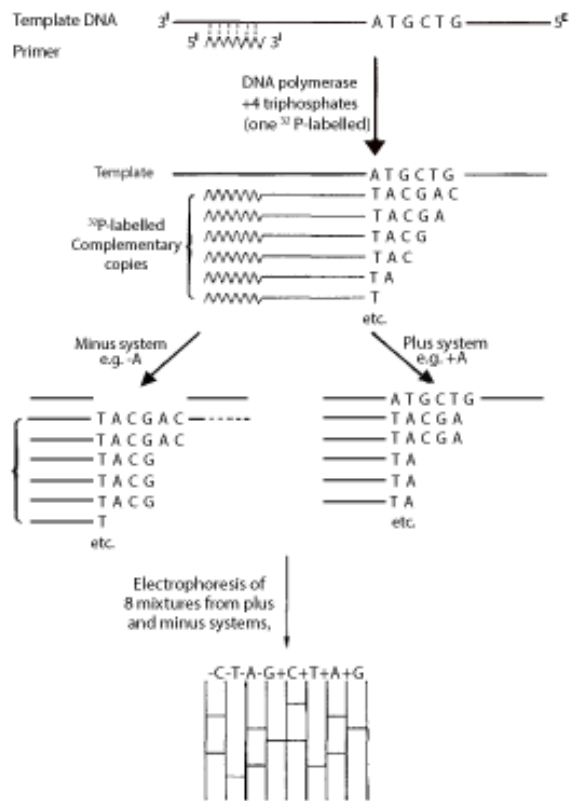
EIKONA 1: Η βάση δεδομένων της ανάπτυξης της νουκλεοτιδικής αλληλούχισης. Ο αριθμός των δημοσιευμένων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών και ο συνολικός αριθμός των ζευγών βάσεων της ακολουθίας απεικονίζονται ως προς την ημερομηνία κατάθεσης ή δημοσίευσης. Τα δεδομένα από το 1981 και πλέον αφορούν στη βάση δεδομένων του NCBI και τα δεδομένα για αλληλουχίες που δημοσιεύθηκαν πριν από το 1981 είναι από την Dayhoff, Nucleic Acid Sequence Database [51].

2. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ 1^H5 ΓΕΝΙΑΣ

2.1 Τεχνική «Προσθήκης και Αφαίρεσης»

Η τεχνική αυτή έθεσε νέους κανόνες στην αλληλούχιση γονιδιωμάτων, εισάγοντας την ηλεκτροφόρηση στα πρωτόκολλα ερευνών, με σκοπό τον διαχωρισμό των προϊόντων του πολυμερισμού. Η μέθοδος ανέλυσε τα προϊόντα της DNA πολυμεράσης η οποία ξεκινούσε από την επέκταση ενός εκκινήτη και βασιζόταν σε δύο διαδοχικές αντιδράσεις πολυμερισμού. Αρχικά, ο πολυμερισμός ξεκινά υπό συνθήκες τέτοιες όπου η σύνθεση της αλληλουχίας είναι αργή και ασυγχρόνιστη. Το αποτέλεσμα ήταν να δημιουργηθούν εκατοντάδες θραύσματα κάθε είδους και μήκους. Στο σημείο αυτό γινόταν η ενσωμάτωση ενός ραδιοσημασμένου ^{-32P-} νουκλεοτιδίου. Έτσι η αλληλουχία που δημιουργείται χωρίζεται σε 8 κλάσματα που χρησιμοποιούνται στην δεύτερη αντίδραση πολυμερισμού. Εδώ η σύνθεση τερματίζεται με συγκεκριμένο τρόπο: Πρώτα ξεκινά μία αντίδραση «προσθήκης» όπου μόνο ένα από τα τέσσερα τριφωσφορικά νουκλεοτίδια είναι παρών με αποτέλεσμα η επέκταση της αλληλουχίας να τελειώνει με την βάση του νουκλεοτιδίου που χρησιμοποιήθηκε. Έπειτα πραγματοποιείται μία αντίδραση «αφαίρεσης» στην οποία υπάρχουν τα τρία από τα τέσσερα τριφωσφορικά νουκλεοτίδια που παράγουν αλληλουχίες φτάνοντας μέχρι τη θέση του επόμενου νουκλεοτιδίου που λείπει. Τα προϊόντα του πολυμερισμού στη συνέχεια θα μπουν σε πηκτή 12% ακρυλαμιδίου, 8 M ουρίας μετουσιωτικής γέλης για ηλεκτροφόρηση. Μετά την ηλεκτροφόρηση το τζελ έρχεται σε επαφή με φιλμ ακτινών X για ορισμένο χρονικό διάστημα [52]. Παρατηρώντας το τζελ και συγκρίνοντας τις οκτώ λωρίδες μεταξύ τους μπορεί κανείς να καταλάβει την ακριβή θέση του κάθε νουκλεοτιδίου στην αλληλουχία, αφού τα μόρια που διαφέρουν από ένα μόνο μήκος νουκλεοτιδίου ξεχωρίζουν ως διακριτές ζώνες στο προκύπτον αυτοραδιογράφημα . *Βλέπε Εικ.2* Με την παραπάνω τεχνική ο Sanger και οι συνεργάτες του κατάφεραν να αλληλουχίσουν το πρώτο γονιδίωμα DNA αυτό του βακτηριοφάγου *φX174*, το οποίο, όπως έχει ήδη αναφερθεί, χρησιμοποιείται μέχρι και σήμερα σαν θετικός μάρτυρας σε πολλά εργαστήρια [13].

F. SANGER AND A. R. COULSON



ΕΙΚΟΝΑ 2: Μέθοδος «Προσθήκης και Αφαίρεσης» των Sanger και Alan Coulson.

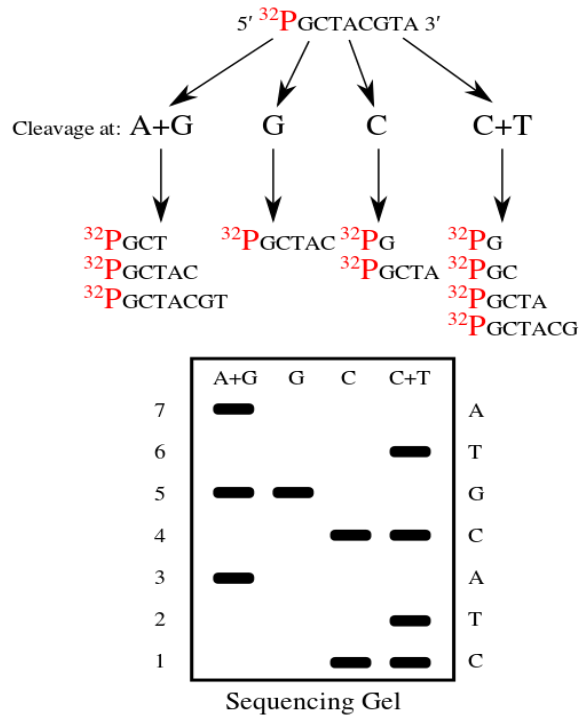
[53]

Το βασικό μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι στο τζελ πολυακρυλαμιδίου εκτός από νουκλεοτίδια της πρότυπης αλληλουχίας υπάρχουν και τα ομοπολυμερή. Τα ομοπολυμερή δεν είναι εύκολο να προσδιοριστούν διότι κατά την ηλεκτροφόρηση ενώ δεν δημιουργούνται ζώνες για αυτά, συμπίπτουν με το εσωτερικό της πρότυπης αλληλουχίας και έτσι το μήκος τους προσδιορίζεται από την απόσταση μεταξύ ζωνών στη πηκτή. Επομένως η μέθοδος δεν είναι αξιόπιστη σε μεγαλύτερες αλληλουχίες [52].

2.2 Χημική Διάσπαση - Chemical Cleavage

Η βασική αρχή της τεχνικής των Allan Maxam και Walter Gilbert είναι η εξής: Το DNA κόβεται με συγκεκριμένη περιοριστική ενδονουκλεάση, έτσι ώστε να δημιουργηθεί το επιθυμητό θραύσμα, το οποίο αργότερα με ηλεκτροφόρηση θα απομονωθεί. Το θραύσμα σε ένα από τα δύο του άκρα το 5' ή το 3' επισημαίνεται με ραδιενεργό στοιχείο, ^{32}P χρησιμοποιώντας αλκαλική φωσφατάση και πολυνουκλεοτιδική κινάση. Εφόσον κάθε αλυσίδα έχει από ένα επισημασμένο άκρο γίνεται αποδιάταξη των δύο κλώνων και έτσι οι δύο μονόκλωνες επισημασμένες αλυσίδες διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου, απομονώνονται και είναι έτοιμες για αλληλούχιση. Αρχικά κάθε κλώνος υφίσταται χημική (αλκαλική) τροποποίηση έτσι ώστε να εκτεθεί η «ραχοκοκαλιά» της πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας. Για να πραγματοποιηθεί η αλληλούχιση απαιτείται μια ακόμα χημική τροποποίηση στοχευμένη στις βάσεις, με στόχο την δημιουργία πολλών θραυσμάτων με ποικίλα μεγέθη. Για την διάσπαση των πουρινών χρησιμοποιείται θειικό διμεθύλιο, το οποίο μεθυλιώνει την αδενίνη/γουανίνη. Η μεθυλίωση αποσταθεροποιεί τον N-γλυκοσιδικό δεσμό, και ο κλώνος σπάει σε αλκαλικό περιβάλλον. Με τον ίδιο τρόπο η υδραζίνη και η πιπεριδίνη χρησιμοποιούνται για την διάσπαση της θυμίνης/κυτοσίνης. Τα θραύσματα μπαίνουν σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου για ηλεκτροφόρηση. Κατά την απεικόνιση της ηλεκτροφόρησης σε ακτίνες X φαίνεται ότι δημιουργούνται μπάντες σκούρες οι οποίες υποδηλώνουν την ύπαρξη της γουανίνης ή κυτοσίνης καθώς και μπάντες φωτεινές οι οποίες υποδηλώνουν την ύπαρξη της αδενίνης ή θυμίνης. *Βλέπε Εικ.3*

Τα δύο βασικά μειονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι τα πολύ επικίνδυνα για τον άνθρωπο χημικά που χρειάζονται και φυσικά το γεγονός ότι χρειαζόταν μεγάλη ποσότητα DNA καθώς πραγματοποιούνται τέσσερις έως οχτώ αντιδράσεις [54].



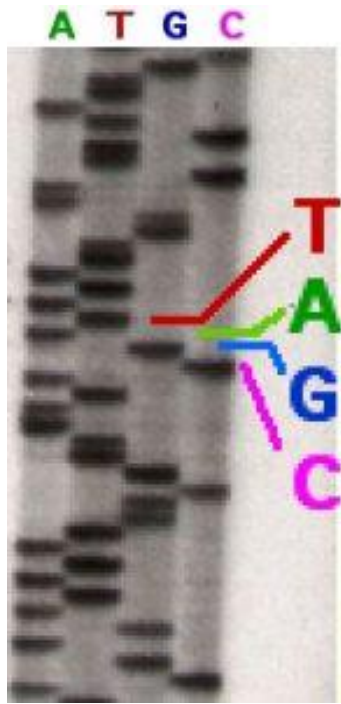
EΙΚΟΝΑ 3: Αλληλούχιση κατά Maxam-Gilbert. Δημιουργούνται ραδιοσημασμένα θραύσματα διαφόρου μεγέθους τα οποία διαχωρίζονται και με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου [55].

2.3 Μέθοδος Τερματισμού Αλυσίδας ή Διδεοξυ-Νουκλεοτιδική

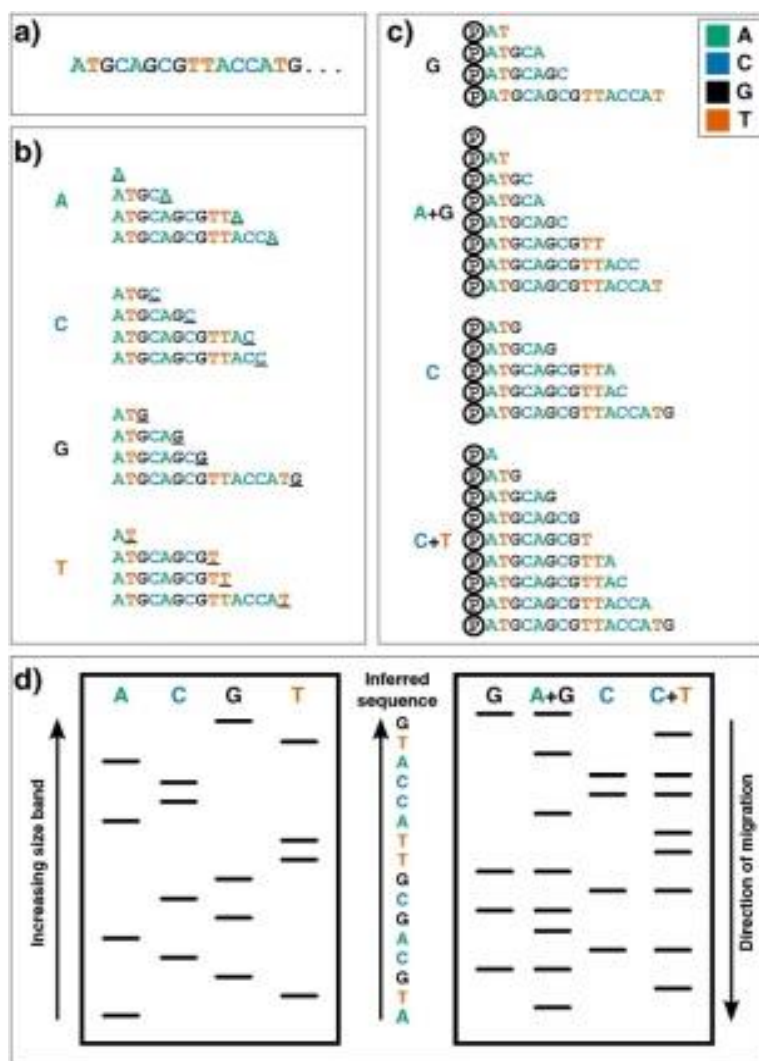
Μέθοδος

Η τεχνική που άλλαξε μια για πάντα την αλληλούχιση γονιδιωμάτων έκανε για πρώτη φορά χρήση των δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs). Τα δυδεοξυριβονουκλεοτίδια (ddNTPs) στερούνται μιας υδροξυλομάδας -OH- στον 3' άνθρακα του σακχάρου και έτσι δεν μπορούν να συνδεθούν με τον φώσφορο του 5' άνθρακα του επόμενου δεοξυριβονουκλεοτιδίου [15]. Σε ένα κανονικό νουκλεοτίδιο, η 3' υδροξυλομάδα δρα ως «άγκιστρο», επιτρέποντας ένα νέο νουκλεοτίδιο να προστεθεί στην υπάρχουσα αλυσίδα [56]. Όλα ξεκινάνε από έναν εκκινητή, ο οποίος είναι συνδεδεμένος σε ένα μετουσιωμένο μόριο DNA, και με την βοήθεια της DNA πολυμεράσης συνθέτουν ένα μονόκλωνο πολυνουκλεοτίδιο χρησιμοποιώντας το μόριο DNA ως πρότυπο. Προσθέτοντας ραδιοσημασμένα δυδεοξυνουκλεοτίδια στην διαδικασία ανάπτυξης DNA με συγκεκριμένη συγκέντρωση δεοξυριβονουκλεοτιδίων δημιουργούνται θραύσματα DNA όλων των πιθανών μεγεθών [1], καθώς δεν υπάρχει διαθέσιμο υδροξύλιο και δεν μπορούν να προστεθούν περαιτέρω νουκλεοτίδια.

Η αλυσίδα τελειώνει με το διδεοξυνουκλεοτίδιο [56]. Έπειτα πραγματοποιούνται τέσσερις παράλληλες αντιδράσεις που περιέχουν κάθε μεμονωμένη βάση ddNTP και τα παράγωγά τους διεξάγονται σε τέσσερις λωρίδες πηκτής πολυακρυλαμιδίου. Βλέπε *Εικόνα 4* Χρησιμοποιώντας αυτοραδιογραφία γίνεται εμφανές ποια είναι η αρχική αλληλουχία του πρότυπου DNA, καθώς υπάρχει μια ραδιενεργή ζώνη στην αντίστοιχη λωρίδα σε αυτή τη θέση του πηκτώματος [1].



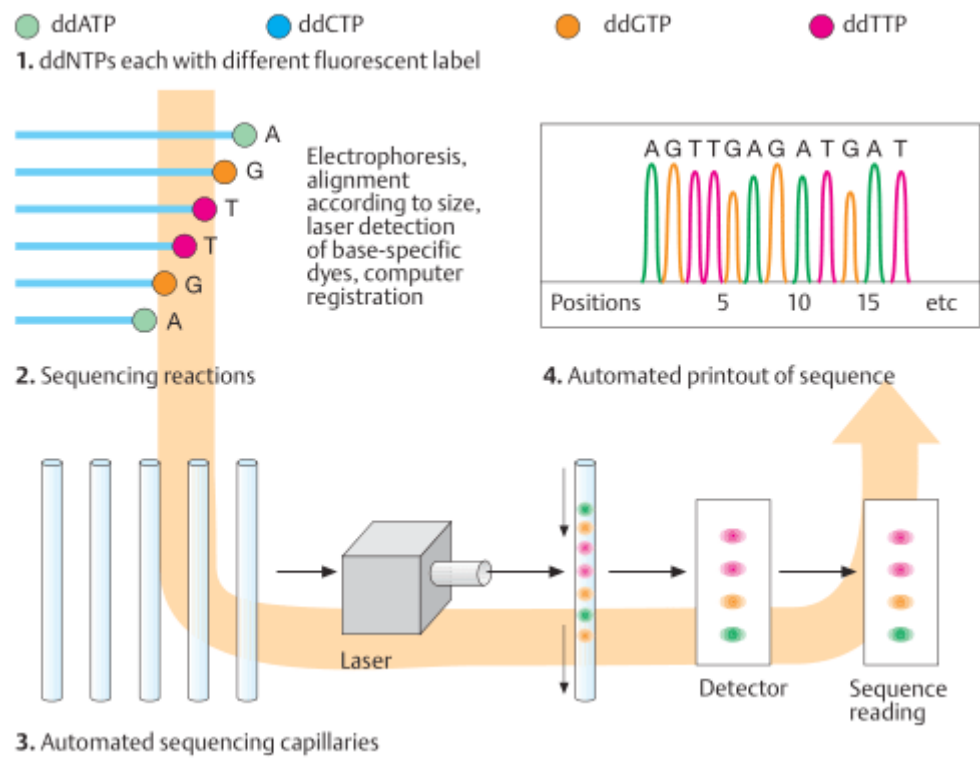
ΕΙΚΟΝΑ 4: Στην εικόνα φαίνεται μια ηλεκτροφόρηση αλληλούχισης όπου τερματίστηκε ο πολυμερισμός με την προσθήκη νουκλεοτιδίου ddATP. Στην πρώτη στήλη τοποθετήθηκε το ddATP, η δεύτερη, η τρίτη και η τέταρτη στήλη περιέχουν ddTTP, ddGTP και ddCTP αντίστοιχα. Κάθε γραμμή αντιπροσωπεύει μόριο DNA συγκεκριμένου μήκους. [57]



ΕΙΚΟΝΑ 5: Τεχνολογίες Αλληλούχισης 1^{ης} Γενιάς. Παράδειγμα του DNA που πρόκειται να υποβληθεί σε προσδιορισμό αλληλουχίας (α) απεικονίζεται υπό την παρουσίαση είτε της αλληλουχίας Sanger (b) είτε της Maxam-Gilbert (c). (b): Η αλληλουχία «τερματισμού της αλυσίδας» του Sanger. (γ): Η μέθοδος «χημικής αλληλουχίας» του Maxam και Gilbert. (d): Τα θραύσματα που παράγονται από οποιαδήποτε από τις δύο μεθοδολογίες μπορούν στη συνέχεια να απεικονιστούν μέσω ηλεκτροφόρησης σε ένα πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου υψηλής ανάλυσης: Οι αλληλουχίες στη συνέχεια συνάγονται με ανάγνωση «προς τα πάνω» καθώς τα μικρότερα θραύσματα DNA μεταναστεύουν ταχύτερα. Στην αλληλουχία Sanger (αριστερά) η αλληλουχία συνάγεται με εύρεση της λωρίδας στην οποία υπάρχει η ζώνη για δεδομένη θέση, καθώς το 3' τερματικό σημασμένο ddNTP αντιστοιχεί στη βάση σε αυτή τη θέση. Ο προσδιορισμός αλληλουχίας Maxam-Gilbert απαιτεί ένα μικρό επιπλέον λογικό βήμα: Η Θυμίνη (T) και η Αδενίνη (A) μπορούν άμεσα να συναχθούν από μια ζώνη στις λωρίδες πυριμιδίνης ή πουρίνης αντίστοιχα, ενώ η Γουανίνη (G) και η Κυτοσίνη (C) υποδεικνύονται από την παρουσία διπλών ζωνών στις λωρίδες G και A + G, ή C και C + T αντίστοιχα [58].

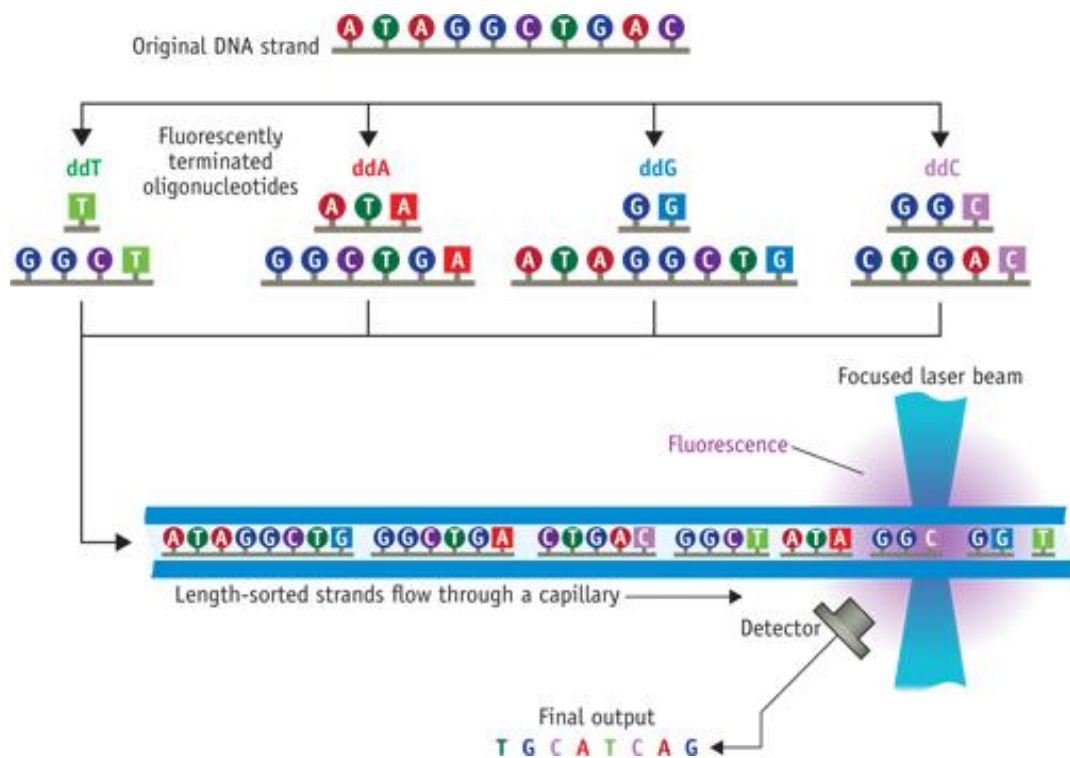
2.3.1 Βιομηχανοποίηση της Τεχνικής “Sanger”

Η πολλά υποσχόμενη τεχνική του Frederic Sanger κινητοποίησε την επιστημονική κοινότητα στο να προβούν άμεσα στην βιομηχανοποίηση της. Αρχικά, οι L. Hood και M. Hunkapiller οι οποίοι συσχετίζονταν με την εταιρεία Applied Biosystems (ABI), έφεραν δύο σημαντικές αλλαγές στην τεχνική «διδοξύ» [59]. Η πρώτη είναι η επισήμανση του γονιδιώματος με φθορίζουσες χρωστικές ουσίες ενώ η δεύτερη αφορά την απόκτηση και την ανάλυση των δεδομένων αλληλούχισης μέσω υπολογιστή. Το μηχάνημα που δημιουργήθηκε (μοντέλο ABI 370) είχε πηκτή πολυακρυλαμιδίου με δεκαέξι λωρίδες. Κατά την διαδικασία της τεχνικής, οι εκκινητές επισημαίνονται με φθορίζουσες χρωστικές. Αρχικά, μία χρωστική χρησιμοποιείται για όλες τις ενέργειες που απαιτούνται για την διεξαγωγή τεσσάρων αντιδράσεων σε γειτονικές λωρίδες του πηκτώματος [60]. Το πρόβλημα στο σημείο αυτό είναι ότι ο αναλυτής «δυσκολεύεται» να συναρμολογήσει την ακολουθία λόγω της διαφορετικής κινητικότητας των ζωνών σε σχέση με τις γειτονικές λωρίδες [59]. Έτσι στην συνέχεια, για κάθε μια από τις τέσσερις διαφορετικές αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκε μια διαφορετική φθορίζουσα χρωστική. Έτσι, όλες οι αντιδράσεις εκτελέστηκαν σε μία λωρίδα με αποτέλεσμα την καλύτερη διακίνηση των μορίων στην πηκτή πολυακρυλαμιδίου. Η φθορίζουσα χρωστική θα ανιχνευθεί σε πραγματικό χρόνο, στον πυθμένα της πηκτής, με τη χρήση ακτίνας λέιζερ. Με βάση τις χρωματογραφίες και τα ηλεκτρογραφήματα που ελήφθησαν και από βαφή μίας χρωστικής και με αυτή των τεσσάρων, μπορεί να διατυπωθεί η αλληλουχία του αναλυθέντος θραύσματος. **Όσον αφορά τις χρωστικές, αξίζει να σημειωθεί ότι χρησιμοποιώντας μία μόνο χρωστική γίνεται δυνατή η αλληλούχιση περίπου 400bp, ενώ με δύο χρωστικές η αλληλούχιση έφτανε τα 200 bp [60]. Βλέπε Εικ. 6**



ΕΙΚΟΝΑ 6: Η πρώτη αυτοματοποιημένη εκδοχή της τεχνικής αλληλούχισης κατά Sanger [61].

Εξέλιξη της παραπάνω τεχνολογίας είναι η λεγόμενη Τριχοειδής Αλληλούχιση κατά Sanger - «Capillary Sanger Sequencing». Αναπτύχθηκε στα μέσα του 1990 όπου τότε κατασκευάστηκε και το πρώτο μηχάνημα (ABI 310) και κυριάρχησε στην «παραγωγή αλληλούχισης» [62-64]. Η τεχνολογία της ηλεκτροφόρησης με τριχοειδή σωληνάρια είναι μια ταχεία τεχνική για τον διαχωρισμό και την ανάλυση των βιοπολυμερών. Χρησιμοποιεί τριχοειδείς σωληνώσεις με στενή οπή (εσωτερική διάμετρο μικρότερη από 100 μm) και μπορεί να αναλύσει περίπλοκα μείγματα γονιδιωμάτων - όπως αυτό του DNA- σε ηλεκτρικό πεδίο υψηλής τάσης. Ο υψηλός λόγος της επιφάνειας προς τον όγκο του μικρού τριχοειδούς σωλήνα διαχέει την θερμότητα που παράγεται κατά την ηλεκτροφόρηση και έτσι το ηλεκτρικό πεδίο είναι υψηλότερο από αυτό της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου. Όσο υψηλότερη είναι η τάση του ηλεκτρικού πεδίου τόσο πιο γρήγορος είναι ο διαχωρισμός. Το αποτέλεσμα είναι, η ηλεκτροφόρηση σε σωληνάρια τριχοειδούς να είναι δέκα φορές πιο γρήγορη από τη κλασική μέθοδο ηλεκτροφόρηση με τη πηκτή πολυακρυλαμιδίου [65].
Βλέπε Εικ. 7



ΕΙΚΟΝΑ 7: Η εξελιγμένη πλέον μέθοδος «διδοξυ» του Sanger, θέλει τα νουκλεοτίδια να είναι επισημασμένα με φθορίζουσες χρωστικές, η ηλεκτροφόρηση να γίνεται σε τριχοειδή σωληνάρια και την αλληλουχία να διαβάζεται μέσω ακτινών λέιζερ [66].

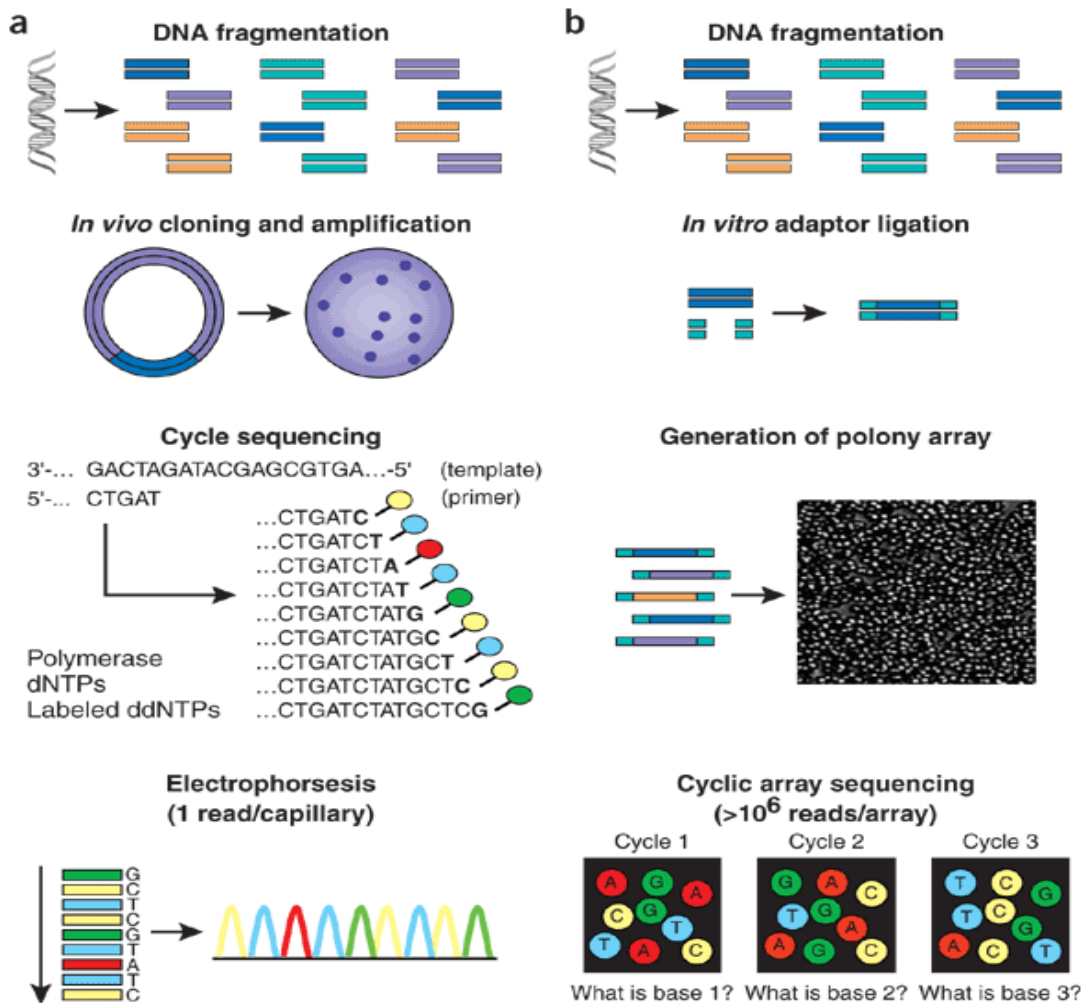
Υπάρχουν δύο τεχνικές όπου χρησιμοποιείται η ηλεκτροφόρηση με τριχοειδή σωληνάρια. Η πρώτη είναι η λεγόμενη “Shotgun de novo Sequencing”, κατά την οποία τυχαία θραύσματα DNA κλωνοποιούνται σε πλασμίδιο υψηλών αντιγραφών τα οποία στην συνέχεια μετασχηματίζονται στο βακτήριο *Escherichia coli*. Έτσι το πρότυπο γονιδίωμα ενισχύεται αφού πλέον υπάρχει σε πολλά κλωνικά αντίγραφα ενός πλασμιδίου, το οποίο μπορεί εύκολα να απομονωθεί από μια βακτηριακή αποικία.

Η δεύτερη τεχνική έχει να κάνει με την ενίσχυση του ζητούμενου γονιδιώματος με την στοχευμένη επαναλληλούχιση. Η ενίσχυση αυτή γίνεται με PCR κατά την οποία οι εκκινητές επικεντρώνονται στο γονιδίωμα-στόχο και έτσι αυτό ενισχύεται με πολλά αντίγραφα μέσω της διαδικασίας PCR. Γίνεται κατανοητό ότι κατά τη διαδικασία της PCR εισάγεται η τεχνολογία της αλληλούχισης κατά Sanger.

Δηλαδή ξεκινώντας με την μετουσίωση ο εκκινητής που είναι συμπληρωματικός συνδέεται με την αλληλουχία του πρότυπου γονιδιώματος και ξεκινάει η επέκταση της αλυσίδας. Κάθε κύκλος επέκτασης τερματίζεται με την προσθήκη επισημασμένων, με φθορίζουσα ουσία, διδεοξυνουκλεοτιδίων (ddNTPs) και έτσι στο τέλος έχει παραχθεί ένα μίγμα διαφόρων μεγεθών επισημασμένα αντίγραφα του πρότυπου γονιδιώματος. Τέλος, η αλληλουχία προσδιορίζεται με ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό υψηλής ανάλυσης των μονόκλωνων επισημασμένων αλυσίδων σε πολυμερές πήκτωμα με τριχοειδή σωληνάρια. Οι φθορίζον χρωστικές διεγείρονται με το λέιζερ και σε συνδυασμό με το φάσμα τεσσάρων χρωμάτων που ανιχνεύονται από τα διάφορα δεοξυριβουοκλεοτίδια παρέχονται όλα τα στοιχεία που θα συνθέσουν την αλληλουχία. Το λογισμικό της μηχανής λαμβάνει αυτά τα στοιχεία σαν αλληλουχία γονιδιώματος και ταυτόχρονα δημιουργεί πιθανότητες σφάλματος για κάθε βάση [67,68]. *Βλέπε Εικ. 8a*

Μετά από τρεις δεκαετίες σταδιακής βελτίωσης, η τεχνολογία του Sanger εφαρμόζεται με επιτυχία στην αναγνώριση αλληλουχίας έως και 1.000 bp με ποσοστό ακρίβειας 99.9% ανά βάση. Το κόστος δε της αλληλούχισης shotgun πλέον υπολογίζεται σε 0,50 δολάρια ανά κιλοβάση [69].

Παρακολουθώντας την πρώιμη αυτή εξέλιξη της τεχνολογίας αλληλούχισης γονιδιώματος γίνεται αντιληπτό ότι σκοπός των μεθόδων αυτών είναι να γίνονται ολοένα και πιο απλές και οικονομικά προσιτές. Ο σκοπός αυτό επιτεύχθηκε με την χρήση και ενσωμάτωση άλλων τεχνολογιών που εμφανίστηκαν και εξελίχθηκαν παράλληλα με τις τεχνικές αλληλούχισης. Χαρακτηριστική είναι η ένταξη της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR) όπου όπως φάνηκε ενίσχυσε την έρευνα για την αλληλούχιση βιοπολυμερών. Τέλος αξίζει να αναφερθεί ότι η τεχνολογία αλληλούχισης 1^{ης} γενιάς χρησιμοποιήθηκε στο πρόγραμμα Ανθρώπινου Γονιδιώματος -Human Genome Program- βοηθώντας στην παράγωγη του πρώτου πλάνου της έρευνας αυτής πολλά χρόνια πριν τη διεξαγωγή του κυρίου προγράμματος [70,71]

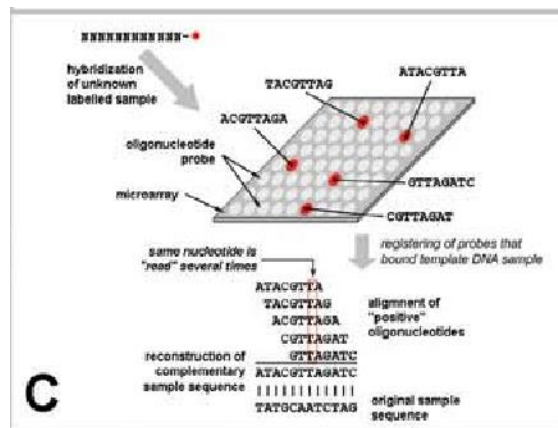


ΕΙΚΟΝΑ 8: α) Ανάλυση αλληλουχίας Sanger με υψηλή απόδοση. Το γονιδιωματικό DNA είναι σε ποικίλου μεγέθους θραύσματα, κατόπιν κλωνοποιείται σε φορέα πλασμιδίου και χρησιμοποιείται για να μετασχηματίσει το *E. coli*. Για κάθε αντίδραση προσδιορισμού αλληλουχίας, μία μοναδική βακτηριακή αποικία συλλέγεται και απομονώνεται το πλασμιδικό DNA. Κάθε αντίδραση αλληλούχησης λαμβάνει χώρα εντός ενός όγκου κλίμακας μικρολίτρων, δημιουργώντας μια σκάλα με προϊόντα επισημασμένα με φθορίζον χρωστική που έχουν τερματιστεί με ddNTP. Αυτά υποβάλλονται σε ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό. Καθώς τα σημασμένα με φθορισμό θραύσματα διακριτών μεγεθών περνούν από τον ανιχνευτή, το φάσμα εκπομπής τεσσάρων καναλιών χρησιμοποιείται για να δημιουργήσει ένα στοιχείο αλληλούχησης. β) Κατά την Αλληλούχηση Shotgun με την μέθοδο κυκλικής συστοιχίας οι προσαρμογείς συνδέονται με τα θραύσματα DNA. Το σύμπλοκο αυτό καταλήγει σε μια σειρά πολλών αποικιών PCR που έχουν ακινητοποιηθεί στον χώρο, στις λεγόμενες "rolonies 15". Κάθε αποικία αποτελείται από πολλά αντίγραφα ενός ενιαίου θραύσματος βιβλιοθήκης. Καθώς όλες οι αποικίες είναι προσκολλημένες σε σε μια επίπεδη συστοιχία εφαρμόζεται σε όλες παράλληλα το αντιδραστήριο. Έτσι, η ανίχνευση φθορίζουσών ετικετών με βάση την απεικόνιση που ενσωματώνεται σε κάθε επέκταση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την απόκτηση δεδομένων αλληλουχίας σε όλα τα χαρακτηριστικά παράλληλα. Διαδοχικές επαναλήψεις ενζυματικής ανάκρισης και απεικόνισης χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία συνεχόμενης ανάγνωσης αλληλουχίας για κάθε διάταξη συστοιχίας [72]

3. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ 2^Ης ΓΕΝΙΑΣ

3.1 Αλληλούχιση με Υβριδοποίηση

Με αυτή την τεχνική οι Σέρβοι ερευνητές προσπάθησαν να καθορίσουν την αλληλουχία του πρότυπου DNA υβριδοποιώντας το με μικρά θραύσματα ολιγονουκλεοτιδίων (5-25 bp). [29] Στην μέθοδο αυτή δοκιμάζονται πολλά ολιγονουκλεοτίδια για την ικανότητα τους να υβριδίζονται στο πρότυπο γονιδίωμα. Κάθε ένα από αυτά που θα υβριδιστεί επιτυχώς σημαίνει ότι είναι συμπληρωματικό με το προς αλληλούχιση γονιδίωμα και έτσι η αλληλουχία είναι πλέον εύκολο να αποκωδικοποιηθεί [73]. Η μέθοδος έχει δύο φάσεις: Την πρώτη κατά την οποία το γονιδίωμα -στόχος είναι ακινητοποιημένο σε στερεή φάση ενώ επισημαίνονται τα ολιγονουκλεοτίδια γνωστής αλληλουχίας. Και την δεύτερη φάση όπου τώρα τα ολιγονουκλεοτίδια είναι παρατεταγμένα σε στερεή επιφάνεια και το υπό αλληλούχιση γονιδίωμα χρησιμοποιείται σαν ανιχνευτής. Βασικός παράγοντας για την επιτυχή διεξαγωγή της διαδικασίας αυτής είναι οι αυστηρές συνθήκες υβριδισμού, καθώς δεν υπάρχει περιθώριο λάθους. Το μήκος της αλληλουχίας που θα διαβαστεί είναι ανάλογο του μήκους των ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν. Με την τεχνική αυτή έγινε δυνατή η αλληλούχιση έως και 340 bp βάσεων [74,75]. Βλέπε *Εικ.9*

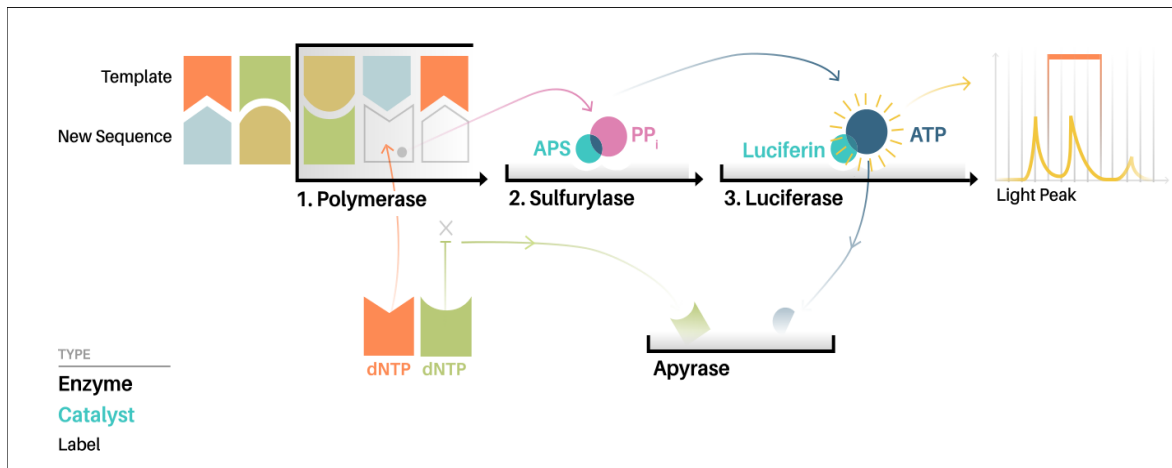


ΕΙΚΟΝΑ 9: Διαδικασία Αλληλούχισης με Υβριδοποίηση [76]

Παρόλο που η τεχνική είχε επιτυχία, στην εφαρμογή της για αλληλούχιση μεγάλου μήκους γονιδιώματος επέφερε αρκετά μειονεκτήματα. Αρχικά, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, όσο μεγαλύτερο ήταν το μήκος της προς αλληλούχιση αλυσίδας, τόσο μεγαλύτερος ο αριθμός ολιγονουκλεοτιδίων θα χρειαστεί. Αυτό θα φέρει δυσκολίες στην διαδικασία υβριδοποίησης κατά την οποία παραπάνω από ένα θραύσμα θα είναι συμπληρωματικό για το ίδιο τμήμα του γονιδιώματος. Κι έτσι στο τέλος θα υπάρχουν περισσότερα από ένα αποτελέσματα ακολουθιών. Για τον ίδιο λόγο, η αλληλούχιση σε επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες δεν προσεγγίζεται με αυτή την μέθοδο [30].

3.1 Pyrosequencing

Η χαρακτηριστική αυτή τεχνική της 2^{ης} γενιάς, χρησιμοποιεί για πρώτη φορά ανίχνευση φωτός που απορρέει κατά την αντίδραση της DNA πολυμεράσης. Οι ερευνητές χρησιμοποίησαν μια μέθοδο φωταύγειας που μετρούσε την πυροφωσφορική σύνθεση [77]. Αρχικά, κάθε δεοξυρυβονουκλεοτίδιο (dNTPs) παίρνει μέρος στην αντίδραση επέκτασης του νουκλεϊκού οξέος με την πολυμεράση. Το πυροφωσφορικό ελευθερώνεται όταν ένα από τα δεοξυρυβονουκλεοτίδια (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) ενσωματωθεί στην αντίδραση της επέκτασης αλυσίδας. Έπειτα η σουλφουρυλάση της τριφωσφορικής αδενοσίνης μετατρέπει το απελευθερωμένο πυροφωσφορικό σε ATP και το φως εκπέμπεται μέσω της λουσιφεράσης που καταλύει την μετατροπή της λουσιφερίνης σε οξυλουσιφερίνη. Ο μέσος αριθμός εκπεμπόμενων φωτονίων ανά αλυσίδα DNA στόχου σε ένα δεδομένο στάδιο είναι ανάλογος προς τον αριθμό των δεοξυριβονουκλεοτιδίων που ενσωματώνονται ανά αλυσίδα στο στάδιο αυτό (η σχέση αυτή είναι γραμμική μόνο για μικρό αριθμό ενσωματώσεων). Η ακολουθία μπορεί στη συνέχεια να προσδιοριστεί απλά παρατηρώντας εάν συμβαίνουν ενσωματώσεις και τον αριθμό των ενσωματώσεων (μετρώντας την ένταση του φωτός) σε μια δεδομένη απόπειρα. Τέλος, η ποσότητα εκπεμπόμενου φωτός μπορεί να μετρηθεί από μια δίοδο φωτός, έναν σωλήνα φωτοπολλαπλασιαστή ή με μια κάμερα συσκευής φορτισμένης σύνδεσης (με ή χωρίς πλάκα μικροδιαύλου) [78]. *Βλέπε Εικ. 10*



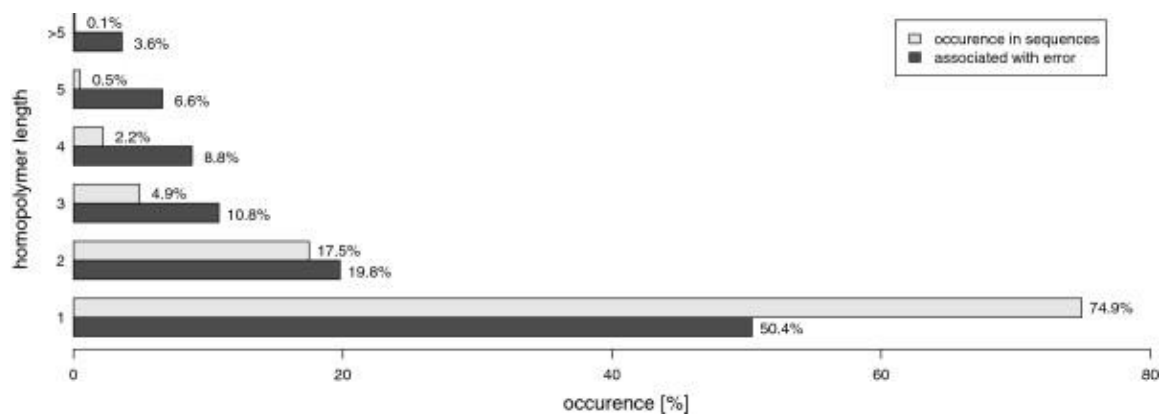
ΕΙΚΟΝΑ 10: Η βασική αρχή της μεθόδου Pyrosequencing [79].

Υπάρχουν δύο διαφορετικές προσεγγίσεις της τεχνικής. Η πρώτη αφορά στην αλληλούχιση σε στερεή φάση. Κατά την αλληλούχιση σε στερεή φάση (χρησιμοποιείται μίγμα τριών ενζύμων) απαιτείται ένα στάδιο πλύσης μεταξύ της προσθήκης των νουκλεοτιδίων και της παραγωγής του ATP που προκύπτει από τη δράση της σουλφουρυλάσης. Με αυτόν τον τρόπο απομακρύνονται τα μη ενσωματωμένα δεοξυριβονουκλεοτίδια, όμως υπάρχει κίνδυνος μείωσης του σήματος του υπό αλληλούχιση μορίου DNA (template). Προκειμένου να αποφευχθεί η μείωση του σήματος, το υπό αλληλούχιση DNA πρέπει να συνδεθεί με ένα στερεό υπόστρωμα, όπως ένα μαγνητικό σφαιρίδιο. Από την άλλη, κατά την αλληλούχιση σε υγρή φάση (χρησιμοποιείται μίγμα τεσσάρων ενζύμων) προστίθεται ένα ένζυμο αποικοδόμησης νουκλεοτιδίων (όπως η απυράση) για την αποφυγή των σταδίων έκπλυσης. Έτσι τα μη αντιδρώντα νουκλεοτίδια και το παραγόμενο ATP αποικοδομούνται από το ένζυμο αυτό [80].

Η μέθοδος αλληλούχισης Pyrosequencing έχει κάποια βασικά πλεονεκτήματα σε σχέση με τις προηγούμενες τεχνικές. Αρχικά, όπως προαναφέρθηκε, είναι απαλλαγμένη από «βαριά» επισημασμένα μόρια και αυτό διευκολύνει την διαχείρισή τους από τους επιστήμονες καθώς καθιστά πιο ασφαλείς τις συνθήκες εργασίας τους. Η διαδικασία απλοποιείται ακόμα περισσότερο καθώς οι αντιδράσεις αλληλούχισης πραγματοποιούνται σε θερμοκρασία δωματίου και σε φυσιολογικό pH.

Εδώ υπάρχει δυνατότητα ανίχνευσης της αλληλουχίας σε πραγματικό χρόνο παρακολούθησης (δύο λεπτά κατά την στερεή φάση) και τέλος, η τεχνική αλληλούχισης pyrosequencing είναι αρκετά πιο οικονομική από τις παραδοσιακές μεθόδους [81]. Τέλος, η μέθοδος αυτή αναδείχθηκε εξίσου ικανή και στην αλληλούχιση πολύπλοκου γονιδιώματος αλλά και μικρού μήκους αλυσίδων [82].

Όπως είναι αναμενόμενο η τεχνική παρουσιάζει και κάποια μελανά σημεία. Το κυριότερο αφορά τα ομοπολυμερή. Είναι δύσκολο να προσδιοριστεί ο ακριβής αριθμός νουκλεοτιδίων που ενσωματώνονται στις ομοπολυμερείς περιοχές, εξαιτίας μιας μη γραμμικής απόκρισης φωτός μετά την ενσωμάτωση περισσότερων από πέντε πανομοιότυπα γειτονικά νουκλεοτίδια. Έχει παρατηρηθεί ότι το φαινόμενο αυτό είναι λιγότερο έντονο για τις G και C ομοπολυμερείς περιοχές [83].



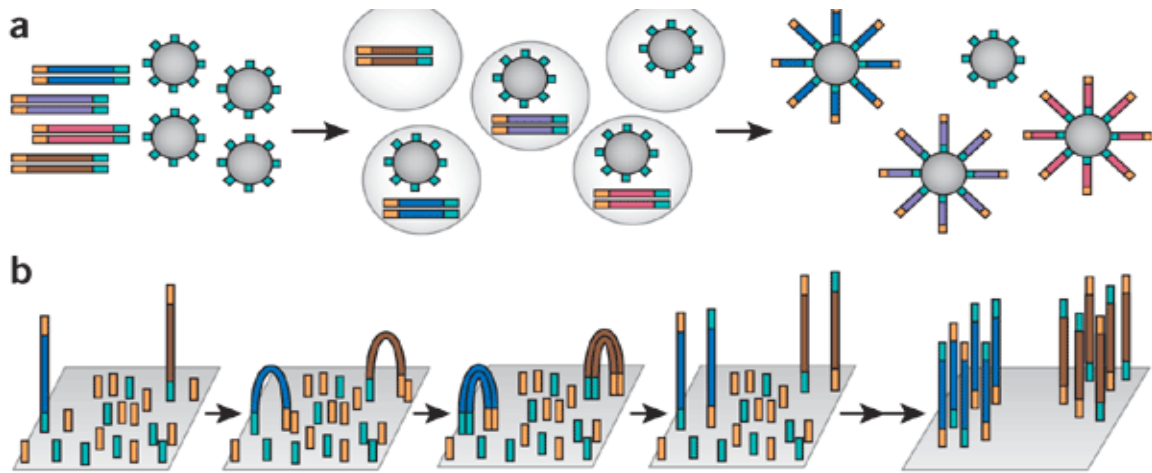
ΕΙΚΟΝΑ 11: Σφάλματα που σχετίζονται με τα ομοπολυμερή. Οι θέσεις σφάλματος ελέγχθηκαν ως προς το αν βρίσκονται ή όχι σε θέση ομοπολυμερούς (μήκος χωρίς ομοπολυμερές = 1). Το ποσοστό διαφορετικών μηκών που επηρεάζεται παρουσιάζεται με σκούρο γκρι. Οι αλληλουχίες αναφοράς ελέγχθηκαν για περιστατικά ομοπολυμερούς και τα ποσοστά των μηκών ομοπολυμερούς απεικονίζονται δίπλα στη σύνδεση σφάλματος (ανοιχτό γκρι) [84].

Ένα άλλο πρόβλημα που παρατηρήθηκε είναι πως κατά την υγρή φάση της τεχνικής η δραστηριότητα της απυράσης μειώνεται σε μεταγενέστερους κύκλους λόγω της συσσώρευσης ενδιάμεσων προϊόντων [82]. Σε συνδυασμό με το γεγονός ότι δεν υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ της απυράσης και του DNA, το αποτέλεσμα είναι με την σταδιακή μείωσή της να μειώνεται και η δραστηριότητα της αποικοδόμησης των «περιττών» νουκλεοτιδίων [85]. Αξίζει να αναφερθεί, ότι στην μέθοδο αυτή χρησιμοποιείται DNA πολυμεράση χωρίς εξωνουκλεάση.

Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η πυκνότητα ενσωμάτωσης των νουκλεοτιδίων στην πολυνουκλεοτιδική αλυσίδα να μην είναι υψηλή. Για την αποφυγή ενός αργού πολυμερισμού απαιτείται DNA πολυμεράση με υψηλή απόδοση πολυμερισμού [83]. Επιπλέον, με την αντικατάσταση αυτή γίνεται πιο αποτελεσματική η ενσωμάτωση νουκλεοτιδίων, γεγονός που απλοποιεί την ανάγνωση του σωστού αριθμού νουκλεοτιδίων στις ομοιοπολυμερές περιοχές [85]. Τέλος, σε περίπτωση μεγαλύτερων αλληλουχιών (ειδικότερα με μεγαλύτερη περιεκτικότητα G και C περιοχών) το γονιδίωμα χρήζει μεγαλύτερης σταθερότητας και μείωση του κόστους αλληλούχισής του.

3.1.1 Βιομηχανοποίηση της Τεχνικής Pyrosequencing

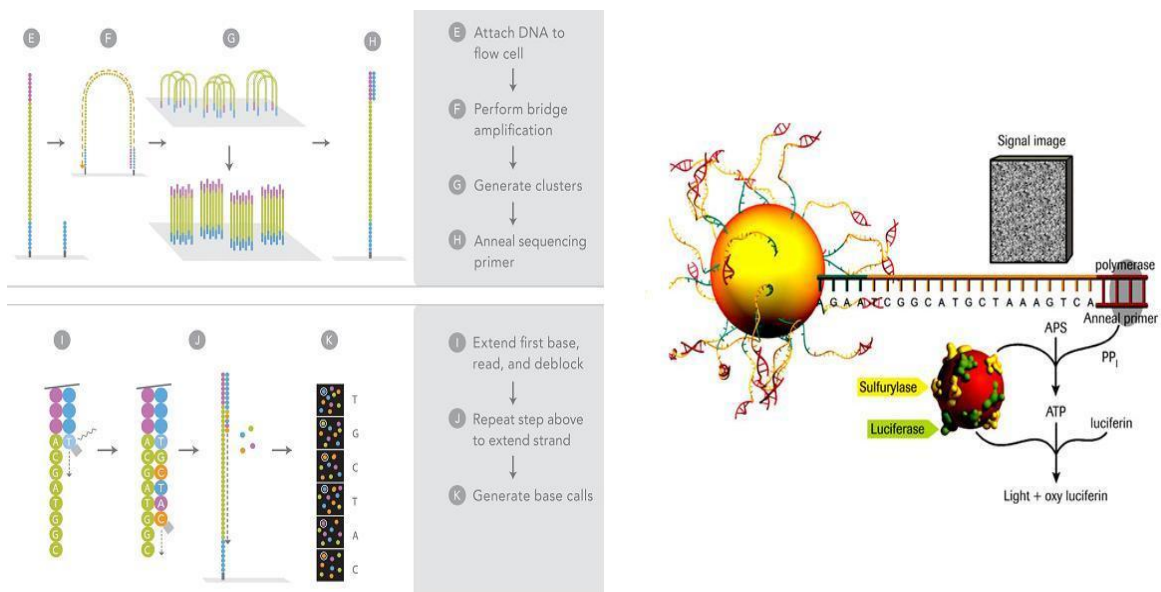
Αργότερα, η εταιρεία Βιοτεχνολογίας 454 Life Sciences (από όπου πήρε το δεύτερο όνομα, 454 Αλληλούχιση) πήρε την τεχνική Pyrosequencing όπου εξελίχθηκε στην πιο εμπορική τεχνολογία αλληλούχησης της νέας γενιάς [37]. Αν και το βιοχημικό «πακέτο» για κάθε τεχνολογία αλληλούχησης είναι διαφορετικό, υπάρχουν κάποια βασικά στάδια τα οποία είναι όμοια μεταξύ τους. Αρχικά, χρειάζεται μια βιβλιοθήκη γονιδιώματος η οποία δημιουργείται από τυχαία θραυσματοποίηση του DNA και στη συνέχεια *in vitro* πρόσδεση σε αυτά κοινών αλληλουχιών προσαρμογέα [86,87]. Στην 454 Αλληλούχηση οι βιβλιοθήκες μπορούν να κατασκευαστούν με οποιαδήποτε μέθοδο που δημιουργεί ένα μείγμα βραχέων θραυσμάτων με πλευρικό προσαρμογέα. Στην πρώτη φάση της διαδικασίας, οι βιβλιοθήκες γονιδιώματος συνδέονται μέσω αλληλουχιών του προσαρμογέα με τα σφαιρίδια. Τα σφαιρίδια αυτά υπόκεινται σε πηκτό εναιώρημα για PCR [88] με στόχο να καλυφθεί το κάθε ένα από αυτά με ένα κλώνο DNA. Με την ένα προς ένα κάλυψή τους με κλώνο DNA, τα σφαιρίδια ενισχύονται στο πηκτό εναιώρημα. Έπειτα τα επικαλυμμένα με DNA σφαιρίδια πλένονται σε πλάκα χωρητικότητας 10^{-12} λίτρα, κάθε σφαιρίδιο μεμονωμένο σε δικό του πηγαδάκι. Η αλληλούχηση με την μέθοδο Pyrosequencing, πραγματοποιείται όταν μικρότερα σφαιρίδια συνδεδεμένα με ένζυμα και dNTPs πλένονται πάνω στην ίδια πλακά. Το πυροφωσφορικό που θα ελευθερωθεί θα μετρηθεί από έναν αισθητήρα συσκευής φορτισμένου ζεύγους (CCD) που βρίσκεται κάτω από τα πηγαδάκια. Με την συσκευή αυτή έγινε δυνατή η αλληλούχηση μορίων μήκους 400 – 500 ζεύγη βάσεων [37]. *Βλέπε Εικ. 12a*



ΕΙΚΟΝΑ 12: Αλληλούχιση 2ης γενιάς. α) Τα μόρια DNA ενισχύονται κλωνικά σε PCR εναιώρημα (emPCR). Η πρόσδεση του προσαρμογέα και η PCR παράγουν βιβλιοθήκες DNA με κατάλληλα άκρα 5' και 3', τα οποία στη συνέχεια μπορούν να γίνουν μονόκλωνα και ακινητοποιημένα σε μεμονωμένα κατάλληλα μικροσφαιρίδια επισημαίνονται με ολιγονουκλεοτίδιο. Τα σύμπλοκα σφαιριδίων-DNA μπορούν στη συνέχεια να γαλακτωματοποιηθούν χρησιμοποιώντας αντιδραστήρια υδατικής ενίσχυσης σε έλαιο, δημιουργώντας ιδανικά σταγονίδια γαλακτώματος που περιέχουν μόνο ένα σφαιρίδιο (απεικονίζεται στα δύο αριστερά σταγονίδια, με διαφορετικά μόρια που υποδεικνύονται σε διαφορετικά χρώματα). Η κλωνική ενίσχυση ακολούθως συμβαίνει κατά τη διάρκεια της emPCR καθώς κάθε πρότυπο DNA είναι φυσικά διαχωρισμένο από όλα τα άλλα, με τα παράγωγα μόρια να παραμένουν συνδεδεμένα στα μικροσφαιρίδια. β) Η τεχνολογία Solexa βασίζεται στη γέφυρα PCR για την ενίσχυση των χαρακτηριστικών της κλωνικής αλληλουχίας. Τα θραύσματα του γονιδιώματος με τους προσαρμογείς ενισχύονται μέσω της PCR, ενώ οι εκκινητές που έχουν ενσωματωθεί με αυτά είναι προσκολλημένοι στην επιφάνεια στερεού υποστρώματος. Στο τέλος της PCR, κάθε κλωνοποιημένο σύμπλεγμα περιέχει ~ 1.000 αντίγραφα ενός μόνο κλώνου του πρότυπου γονιδιώματος [89].

Η αλληλούχιση βιοπολυμερών με την τεχνολογία Pyrosequencing της εταιρείας 454 Life Sciences, βήμα προς βήμα γίνεται ως εξής: Πρώτα τα σφαιρίδια που φέρουν τον προσαρμογέα επωάζονται με την πολυμεράση του *Bacillus stearothermophilus* (*Bst*) και με την μονόκλωνη πρωτεΐνη δέσμησης. Έπειτα, το μίγμα αυτό μπαίνει σε μια μικροσκοπική συστοιχία φρεατίων κλίμακας picoliters. Σε κάθε φρεάτιο που φέρει ένα σφαιρίδιο με τον προσαρμογέα του, προστίθεται και ένα ακόμα μικρότερο σφαιρίδιο το οποίο αποτελείται από ακινητοποιημένα ένζυμα (ATP ,σουλφουρυλάση και λουσιφεράση) που απαιτούνται για την διεξαγωγή της αλληλούχισης.

Με αυτόν τον τρόπο, η φύση του δείγματος γίνεται συμβατή για την αλληλούχιση που βασίζεται στην συστοιχία. Έχοντας αυτά σαν δεδομένα ξεκινά η αλληλούχιση. Κατά την διαδικασία, η μία πλευρά της ημι-διατεταγμένης συστοιχίας λειτουργεί ως κυψέλη ροής για την εισαγωγή και αφαίρεση των αντιδραστηρίων προσδιορισμού αλληλουχίας, ενώ στην άλλη είναι συνδεδεμένη μια δέσμη οπτικών ινών για ανίχνευση σημάτων με CCD. Σε κάθε ένα από τους εκατοντάδες κύκλους εισάγεται ένα μόνο είδος μη επισημασμένου νουκλεοτιδίου. Για κάθε ένα νουκλεοτίδιο που θα ενσωματωθεί στην αντίδραση επέκτασης της αλυσίδας ελευθερώνεται πυροφωσφορικό. Η έκρηξη φωτός όπως είπαμε ανιχνεύεται από το CCD αφού είναι σε αντιστοιχία με τις συντεταγμένες συστοιχίες συγκεκριμένων φρεατίων. Η αλληλούχιση παρακολουθείται ζωντανά με κάμερα η οποία καταγράφει το μοτίβο των γεγονότων που ανιχνεύονται από την ενσωμάτωση, και με αυτό τον τρόπο ανιχνεύεται η αλληλουχία που αντιπροσωπεύεται από τα μεμονωμένα σφαιρίδια [90]. Βλέπε *Εικ. 13^A*



ΕΙΚΟΝΑ 13: A) Στην ανάλυση αλληλουχίας 454, η ενσωμάτωση νουκλεοτιδίου ανιχνεύεται με μια αντίδραση λουσιφεράσης που εκπέμπει φως και ονομάζεται pyrosequencing. (B) Η μέθοδος προσδιορισμού αλληλουχίας Illumina χρησιμοποιεί ενίσχυση στερεάς φάσης μορίων DNA ακολουθούμενη από ενσωμάτωση νουκλεοτιδίων σεσημασμένων με φθορισμό [91].

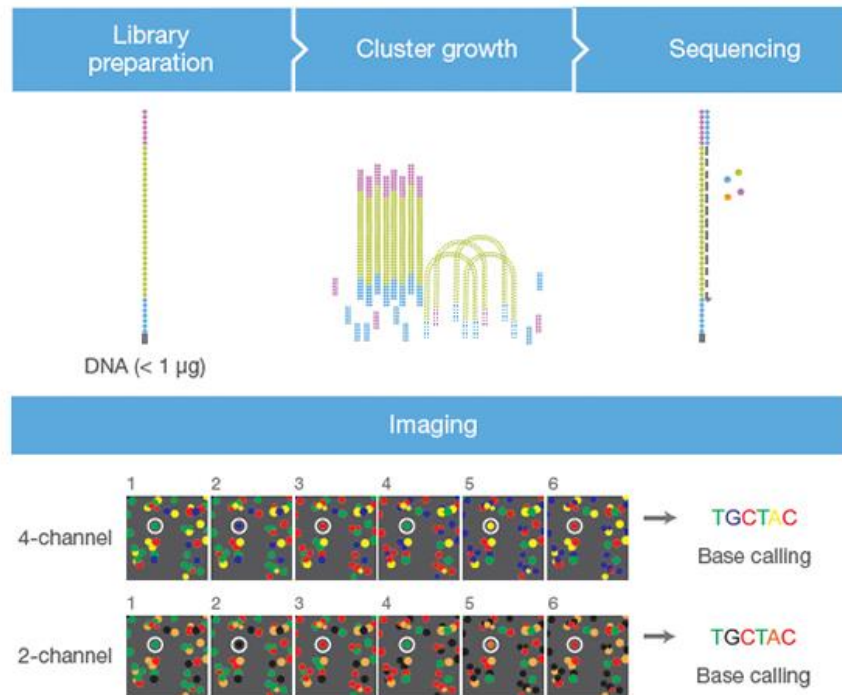
Το μειονέκτημα της αυτοματοποιημένης μεθόδου έχει πάλι να κάνει με τα ομοπολυμερή. Επειδή δεν υπάρχει τερματικό τμήμα που εμποδίζει πολλαπλές διαδοχικές ενσωματώσεις σε ένα δεδομένο κύκλο, το μήκος όλων των ομοπολυμερών πρέπει να συναχθεί από την ένταση του σήματος. Σε σχέση με άλλες πλατφόρμες επόμενης γενιάς, το βασικό πλεονέκτημα της πλατφόρμας 454 είναι η διάρκεια ανάγνωσης. Για παράδειγμα, το όργανο 454 FLX παράγει ~ 400.000 μετρήσεις ανά διαδρομή οργάνων σε μήκος από 200 έως 300 bp. Όσον αφορά το κόστος, το 2008 το κόστος ανά δευτερόλεπτο αλληλουχίας με την πλατφόρμα 454 ήταν πολύ μεγαλύτερο από αυτό των άλλων πλατφορμών (π.χ. SOLiD και Solexa) [90].

3.1.2 Solexa / Illumina Sequencing

Η τεχνολογία αυτή μπορεί να χαρακτηριστεί ως η εξέλιξη της 454 Αλληλούχισης και βασίζεται κι αυτή στην αλληλούχιση με σύνθεση. Αρχικά στη μέθοδο αυτή, το πρότυπο DNA «κόβεται» σε θραύσματα και δύο διαφορετικές ομάδες προσαρμογέων προσκολλούνται στα δύο άκρα κάθε θραύσματος. Η μία ομάδα είναι για την σύνδεση της κυπελίδας ροής και η δεύτερη χρειάζεται για την αλληλούχιση. Τα θραύσματα αυτά μετουσιώνονται και οι μονόκλωνες πια αλυσίδες εγχέονται εντός του κυττάρου ροής. Η επιφάνεια των κυττάρων ροής καλύπτεται από ένα πυκνό στρώμα εκκινητών συμπληρωματικών με την αλληλουχία των προσαρμογέων. Έτσι οι μονόκλωνες αλυσίδες θα προσκολληθούν στην επιφάνεια των κυττάρων ροής. Η ένωση των προσκολλημένων εκκινητών με τους προσαρμογείς στο ελεύθερο άκρο του πρότυπου μονόκλωνου DNA οδηγεί στη δημιουργία «γέφυρας» μεταξύ τους, διαδικασία γνωστή ως «Γέφυρα Ενίσχυσης». Στην συνέχεια πραγματοποιείται PCR, κατά την οποία παράγεται ο δεύτερος συμπληρωματικός κλώνος. Με την μετουσίωση που πραγματοποιείται κατά την PCR έχουμε διάσπαση των προϋπάρχουσων γεφυρών και κατά το στάδιο της υβριδοποίησης δημιουργία νέων από κάθε σκέλος. Επαναλαμβάνοντας τη διαδικασία ενίσχυσης της γέφυρας, δημιουργείται ένα μικρό σύμπλεγμα περίπου 1000 κλωνικά ενισχυμένων θραυσμάτων. *Βλέπε Εικ. 12b* Το σύμπλεγμα αυτό των κλώνων αποσπάται και ξεπλένεται. Οι μονόκλωνες αλυσίδες όπου θα παραμείνουν μετά την πλύση χρησιμοποιούνται σαν πρότυπο για τον επόμενο κύκλο αλληλούχισης.

Η διαδικασία, στη συνέχεια, απαιτεί νουκλεοτίδια αναστρέψιμου τερματισμού [92]. Τα νουκλεοτίδια αυτά είναι τροποποιημένα με δύο διαφορετικούς τρόπους. Πρώτον, έχει δημιουργηθεί στην θέση 3' του υδροξυλίου ένα χημικώς διασπάζσιμο τμήμα, το οποίο επιτρέπει την ενσωμάτωση μόνο μιας βάσης σε κάθε κύκλο της PCR. Δεύτερον, ένα από τα τέσσερα φθορίζοντα στοιχεία (που είναι επίσης χημικά διασπώμενα) με τα οποία επισημαίνονται τα νουκλεοτίδια αντιστοιχεί στην ταυτότητα του κάθε νουκλεοτιδίου. Αυτό αρχικά προσδίδει την ικανότητα προσθήκης τεσσάρων dNTPs την ίδια στιγμή και τελικά τερματίζει και η επέκταση της αλυσίδας [93]. Ξεκινώντας την επέκταση της αλυσίδας τα συμπληρωματικά νουκλεοτίδια ενσωματώνονται και τα υπόλοιπα αποσύρονται. Με την βοήθεια του φθορίζον σήματος των τροποποιημένων νουκλεοτιδίων γίνεται δυνατή η καταγραφή εικόνας του κυττάρου ροής. Έπειτα διεξάγεται μια χημική διεργασία έτσι ώστε να απομακρυνθεί η φθορίζουσα βαφή από τα τροποποιημένα νουκλεοτίδια αλλά και να ανακτηθεί η θέση 3' της υδροξυλομάδας (OH). Τότε η επόμενη ομάδα των dNTPs εισέρχεται στο κύτταρο ροής, ενσωματώνεται και καταγράφονται καινούργιες εικόνες με τον ίδιο τρόπο. Στο τέλος όλες οι εικόνες από όλους τους κύκλους θα μαζευτούν και θα εκτεθούν έτσι ώστε το λογισμικό SOLEXA να μπορέσει να ανασυνθέσει την ακριβή αλληλουχία του πρότυπου συμπλέγματος των θραυσμάτων. Η διαδικασία αυτή αφορά τον έναν μόνο κλώνο του συμπλέγματος και γι' αυτό ονομάζεται «Ακολουθία Μιας Ανάγνωσης» [92].

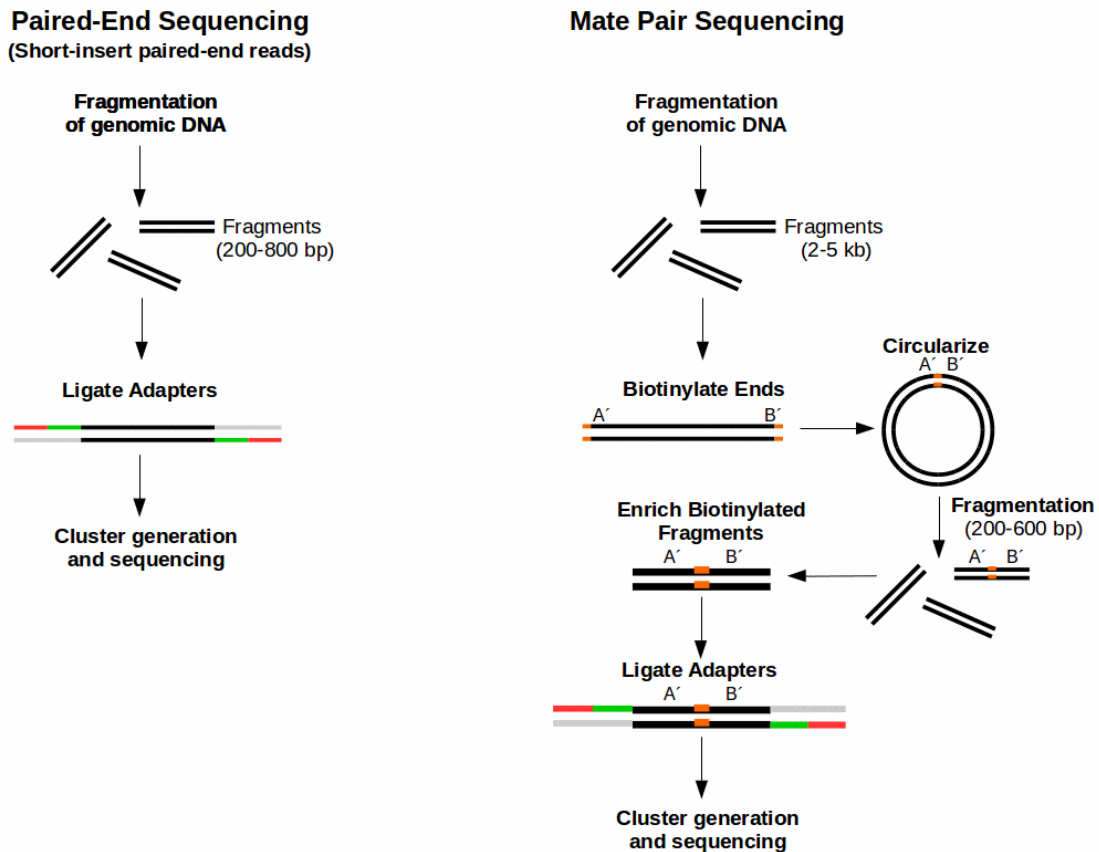
Βλέπε Εικ. 13a και 14



ΕΙΚΟΝΑ 14: Τα θραύσματα DNA δεσμεύουν το κύτταρο ροής μέσω των προσαρμογών. Στη συνέχεια, η ενίσχυση γέφυρας με μη επισημασμένο νουκλεοτίδιο δημιουργεί συστάδες. Νουκλεοτίδια επισημασμένα με διαφορετικές χρωστικές ενσωματώνονται και ανιχνεύονται με μια κάμερα CCD [94].

Στην αλληλουχία «Ζευγαρωμένης Ανάγνωσης» γίνεται αλληλούχιση δίκλωνου μορίου. Είναι απαραίτητο δηλαδή οι μονόκλωνες αλυσίδες του συμπλέγματος θραυσμάτων να ξαναγίνουν διπλές, αφού ο συμπληρωματικός τους κλώνος έχει ήδη αφαιρεθεί. Καθώς υπάρχουν διαφορετικοί προσαρμογείς στα άκρα κάθε κλώνου, ο συμπληρωματικός κλώνος θα δημιουργηθεί με βάση την συμπληρωματικότητα της αλληλουχίας του εκκινητή με οποιονδήποτε προσαρμογέα από τους δύο [92]. Η συνέχεια της διαδικασίας «Ζευγαρωμένης Ανάγνωσης» χρήζει την ανάγκη εισαγωγής της τεχνολογίας “Matte Pair Sequencing”. Το πρόβλημα έγκειται στο μέγεθος του βιομορίου που θα εισαχθεί. Με την διαδικασία που αναφέρθηκε παραπάνω δεν είναι δυνατή η αλληλούχιση μεγαλύτερου θραύσματος και έτσι έχει δημιουργηθεί ένας «παράδρομος». Αρχικά, απομονώνονται τα επιθυμητά θραύσματα και στις άκρες τους προστίθεται βιοτίνη. Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ότι η προσθήκη βιοτίνης ενισχύει το μόριο σε κάθε είδους περιβάλλον που θα βρεθεί χωρίς όμως να εμποδίζει τις φυσιολογικές λειτουργίες του.

Στην συνέχεια της διαδικασίας, τα άκρα βιοτίνης οδηγούν τα θραύσματα σε κυκλοποίηση. Τα πλέον κυκλικά μόρια κατακερματίζονται και έτσι δημιουργούνται θραύσματα βιοτίνης-γονιδιώματος [95]. Το σημαντικό σημείο εδώ είναι πως το παραγόμενο θραύσμα περιέχει τα άκρα του αρχικού μακριού θραύσματος. Οι προσαρμογείς τώρα μπορούν να συνδεθούν στα υβριδικά αυτά θραύσματα και η αλληλούχιση πραγματοποιείται όπως περιγράφηκε παραπάνω. *Βλέπε Εικ. 15*



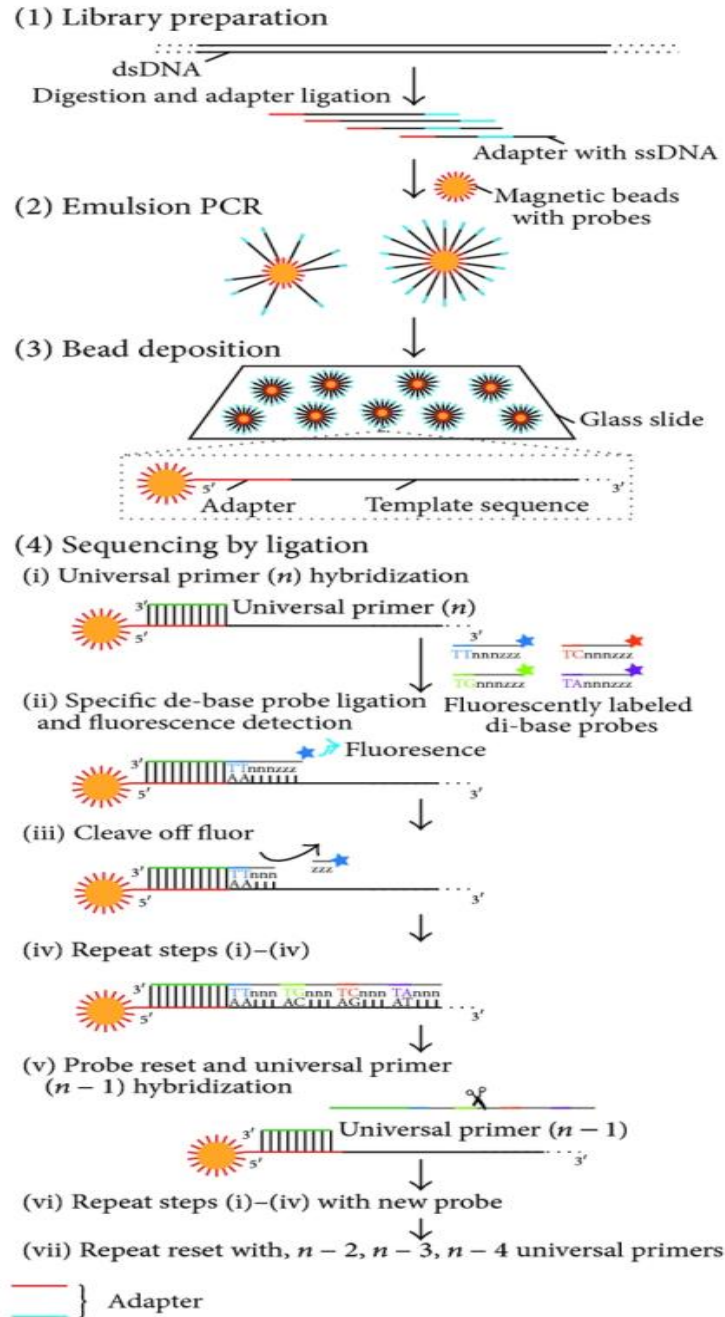
EΙΚΟΝΑ 15: Mate Pair Sequencing. Με την προσθήκη βιοτίνης στα άκρα του θραύσματος γονιδιώματος γίνεται δυνατή η αλληλούχιση μεγάλου μορίου [96].

Τα σφάλματα στην τεχνολογία Illumina/Solexa αφορούν κυρίως γεγονότα που προκαλούν απώλεια σήματος, ατελή διάσπαση των φθορίζουσών «ετικετών» ή άλλων παραγόντων. Ο κυρίαρχος τύπος σφάλματος αφορά την υποκατάσταση. Ο μέσος όρος σφάλματος ανέρχεται στο 1–1.5%, ενώ σε υψηλού βαθμού ακρίβειας βάσεις φτάνει το 0,1% ή και λιγότερο. Τα σφάλματα αυτά είναι δυνατόν να αναγνωριστούν με μετρήσεις ποιότητας που σχετίζονται με την κάθε βάση ξεχωριστά. Τέλος, αξίζει να αναφερθεί πως τα ομοπολυμερή δεν αποτελούν μεγάλο πρόβλημα στην τεχνική αυτή.

3.2 Αλληλούχιση με Σύνδεση Ολιγονουκλεοτιδίων και Ανίχνευση (SOLiD)

Η Αλληλούχιση με Σύνδεση Ολιγονουκλεοτιδίων και Ανίχνευση περιγράφηκε από τους J.S. και συνεργάτες το 2005 [97] και έγινε εμπορικό προϊόν της εταιρείας Applied Biosystems το 2006 με την εργασία των McKernan και συνεργατών [98]. Η τεχνολογία αυτή βασίζεται στην σύνδεση με λιγάση. Τα αρχικά στάδια της μεθόδου είναι παρόμοια με αυτά της 454 Αλληλούχισης, δηλαδή, με την προϋπόθεση ότι το πρότυπο γονιδίωμα είναι ένα δίκλωνο μόριο DNA, αυτό κατακερματίζεται και δύο διαφορετικοί προσαρμογείς προσκολλούνται σε κάθε άκρο των θραυσμάτων που δημιουργούνται [99]. Τα θραύσματα αυτά στη συνέχεια θα αναμιχθούν με παραμαγνητικά σφαιρίδια μεγέθους 1μM [100]. Κάθε θραύσμα συνδέεται με ένα σφαιρίδιο και αναμειγνύονται με τα αντιδραστήρια της PCR. Κάθε ένα σφαιρίδιο, στην συνέχεια, θα μπει σε μικροαντιδραστήρα μέσα σε εναιώρημα γαλακτώματος / νερού και τελικά το θραύσμα κάθε σφαιριδίου θα ενισχυθεί μέσω της διαδικασίας PCR. Περνώντας στη χαρακτηριστική, για την τεχνική αυτή, φάση τα σφαιρίδια τοποθετούνται πάνω σε στερεή γυάλινη επιφάνεια. Εκεί οι βάσεις διαβάζονται εξετάζοντας τα σφαιρίδια. Αυτό επιτυγχάνεται με την προσθήκη ενός μείγματος οκταμερών εκκινητών επισημασμένων με 5' φθορίζουσα χρωστική. *Οι αριθμοί 3' και 5' ορίζουν την κατεύθυνση της πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας* Σημειώνεται ότι μόνο οι τελευταίες δύο 3' βάσεις του εκκινητή είναι γνωστές, και όλες οι άλλες είναι εκφυλισμένες. Άρα λοιπόν, οι συνδυασμοί που μπορούν να προκύψουν είναι δεκαέξι, όσες και φθορίζουσες χρωστικές που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν. Κάθε εκκινητής επισημαίνεται με συγκεκριμένη φθορίζουσα χρωστική ανάλογα με τις δύο 3' γνωστές βάσεις του. Για παράδειγμα, κάθε βάση AG καθώς και η συμπληρωματική της TC θα έχουν την ίδια χρωστική και ούτω καθεξής. Με την προσθήκη εκκινητή –ολιγονουκλεοτιδίου- συμπληρωματικού με την αλληλουχία του προσαρμογέα ξεκινά η διαδικασία της αλληλούχισης και προκύπτει υβριδισμός μεταξύ της τελευταίας 3' βάσης του εκκινητή με τον προσαρμογέα. Στην συνέχεια προστίθεται ένα μείγμα επισημασμένων με την ίδια χρωστική ανιχνευτών. Εάν οι δύο γνωστές 3' βάσεις του εκκινητή βρουν συμπληρωματική αλληλουχία η DNA λιγάση συνδέει τον εκκινητή με τον ανιχνευτή. Το εκπεμπόμενο φθορίζον σήμα καταγράφεται.

Έπειτα, οι τρεις 5' βάσεις του ανιχνευτή που απέμειναν εκφυλίζονται με την εισαγωγή της επόμενης ομάδας εκκινητών, η οποία είναι επισημασμένη με διαφορετική χρωστική. Στην περίπτωση όπου πάλι θα βρεθεί συμπληρωματική αλληλουχία μεταξύ των δύο 3' βάσεων του εκκινητή και ενός ανιχνευτή, ο δεύτερος ανιχνευτής συνδέεται με στον πρώτο. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται συνολικά τέσσερις φορές. Μετά από τέσσερις κύκλους σε κάθε ανιχνευτή είναι δυνατόν να διαβαστούν δυο νουκλεοτίδια και τα υπόλοιπα τρία παραλείπονται. Η προσθήκη τεσσάρων ομάδων ανιχνευτών μπορεί να γίνει **X** φορές και σε κάθε έναν κύκλο θα προστίθεται και ένας ανιχνευτής. Όταν τελειώσουν οι **X** κύκλοι θα αφαιρεθεί ο εκκινητής με την αλυσίδα ανιχνευτών και ένας νέος εκκινητής θα υβριδοποιηθεί στο σφαιρίδιο. Ο νέος εκκινητής θα προσδεθεί σε μία θέση (βάση) μακριά από τον σύμπλοκο προσαρμογέ-γονιδιώματος με κατεύθυνση προς το άκρο 5'. Το αποτέλεσμα είναι, όταν ξεκινήσουν οι καινούργιοι κύκλοι σύνδεσης ανιχνευτών με λιγάση η πρώτη από τις δύο γνωστές βάσεις να εξεταστεί ξανά με μαζί με την νέα 5' βάση. Κάθε βάση διερευνάται δύο φορές. Στο σημείο αυτό πρέπει να σημειωθεί ότι δεν είναι γνωστό ποια βάση αναγνωρίστηκε από τους ανιχνευτές στην πρώτη ή στην δεύτερη επανάληψη καθώς οι ανιχνευτές έχουν επισημανθεί με την ίδια φθορίζουσα βαφή [99].

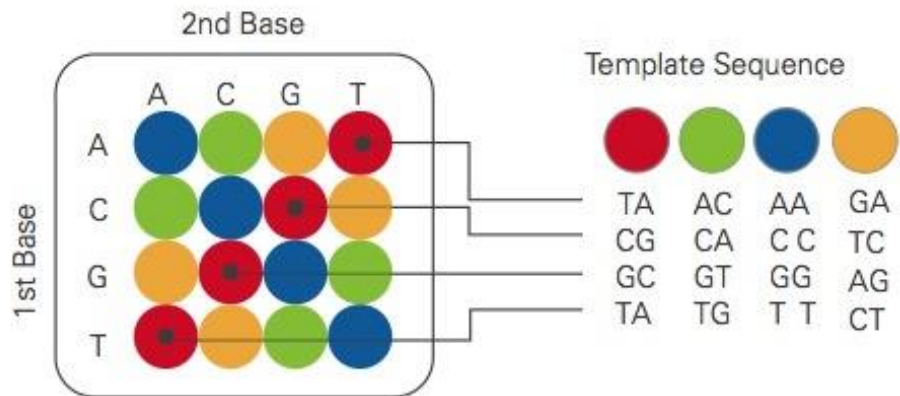


ΕΙΚΟΝΑ 16: Αλληλούχιση με Σύνδεση Ολιγονουκλεοτιδίων και Ανίχνευση. (1) Προετοιμασία βιβλιοθήκης: δύο διαφορετικοί προσαρμογείς συνδέονται με θραύσματα γονιδιώματος. (2) PCR με εναιώρημα: εναιώρημα PCR διεξάγεται χρησιμοποιώντας μαγνητικά σφαιρίδια για να δημιουργηθούν «κλώνοι σφαιριδίων», όπου το καθένα περιέχει ένα μοναδικό είδος νουκλεϊκού οξέος. (3) Απόθεση σφαιριδίων: τα σφαιρίδια στη συνέχεια προσαρτώνται σε γυάλινη επιφάνεια. (4) Αλληλουχία με πρόσδεση: η αλληλούχιση με τη μεσολάβηση της λιγάσης ξεκινά με την υβριδοποίηση ενός εκκινητή με τον προσαρμογέα κάθε ενισχυμένου θραύσματος.

(i) και στη συνέχεια εισάγεται η DNA λιγάση μαζί με συγκεκριμένα φθορίζοντα επισημασμένα οχταμερή ανιχνευτών, όπου οι δύο βάσεις στο 3' άκρο του ανιχνευτή κωδικοποιούνται από τη συνημμένη ομάδα φθορισμού. Με κάθε υβριδοποίηση ανιχνευτή με εκκινητή εκπέμπεται φθορίζον σήμα (ii) και έπειτα εκφυλίζονται οι υπόλοιπες βάσεις του οχταμερούς (iii) και ταυτόχρονα προετοιμάζεται η επόμενη ομάδα ανιχνευτή για έναν άλλο κύκλο σύνδεσης. (iv- vii) Δεδομένου ότι κάθε φθορίζουσα ομάδα σε ένα συνδεδεμένο οχταμερές αναγνωρίζει έναν συνδυασμό δύο βάσεων, η προκύπτουσα ακολουθία ανάγνωσης προσδίδει μια υψηλής ποιότητας αλληλούχιση [101].

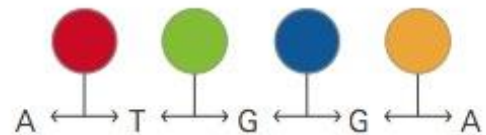
Για να «αποκρυπτογραφηθούν» οι βάσεις πίσω από τα δύο σήματα φθορισμού που έχει κάθε μία οι επιστήμονες ανέπτυξαν έναν τεχνητό κώδικα τεσσάρων χρωμάτων (προσοχή δεν έχει σχέση με τις χρωστικές που επισημάνθηκαν οι ανιχνευτές). Το σύστημα αυτό δουλεύει ως εξής: Όπως αναφέρθηκε σε κάθε βάση αντιστοιχούν δύο σήματα φθορισμού. Όταν ένας κόκκινος φθορισμός ακολουθείται από κόκκινο φθορισμό το σήμα που λαμβάνεται είναι μπλε, ο κίτρινος φθορισμός ακολουθούμενος από κίτρινο δίνει κυανό φθορισμό, όταν ο κίτρινος φθορισμός ακολουθείται από έναν κόκκινο τότε το σήμα πράσινο και ούτω καθεξής. Αφού κάθε χρώμα αντιστοιχεί στην πρώτη και στην δεύτερη αναγνωρίσιμη βάση, ο υπολογιστής με βάση τη σειρά των τεσσάρων χρωμάτων είναι σε θέση να συνθέσει την αλληλουχία των βάσεων με δεδομένο ότι η ταυτότητα και το χρώμα των βάσεων # 1 και # 2 επηρεάζουν την ταυτότητα και το χρώμα των βάσεων # 2 και # 3. Η τεχνολογία SOLiD μπορεί να αλληλουχίσει έως και 50bp. Το πλεονέκτημα της είναι ότι κάθε βάση εξετάζεται διπλά ενώ αντίστοιχα το μειονέκτημα της είναι ο χρόνος αλληλούχισης σε συνδυασμό και με το μήκος αλληλούχισης [99].

Possible Dinucleotides Encoded By Each Color



Double Interrogation

With 2 base encoding each base is defined twice



EIKONA 17: Τεχνητός Κώδικας Τεσσάρων Χρωμάτων (Colour Space by ABI). Τα δινουκλεοτίδια CA, AC, TG και GT κωδικοποιούνται όλα από την πράσινη χρωστική ουσία. Επειδή κάθε βάση διερευνάται δύο φορές, είναι δυνατόν, χρησιμοποιώντας τα δύο χρώματα, να προσδιοριστεί ποιες βάσεις ήταν και σε ποιες θέσεις [102].

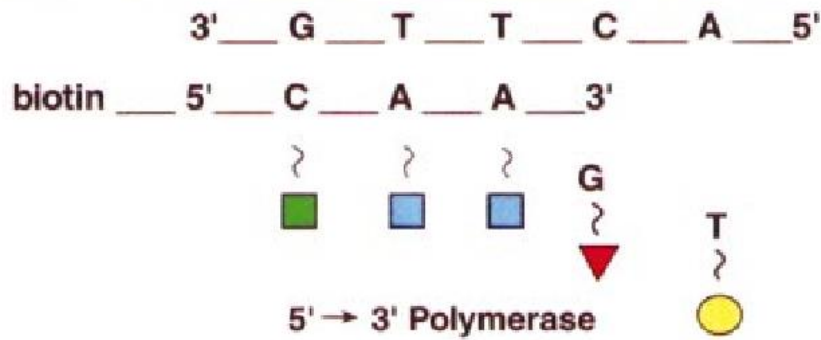
4. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ 3^{ΗΣ} / ΝΕΑΣ ΓΕΝΙΑΣ

4.1 Αλληλούχιση Μεμονωμένου Μορίου με Εξωνουκλεάση

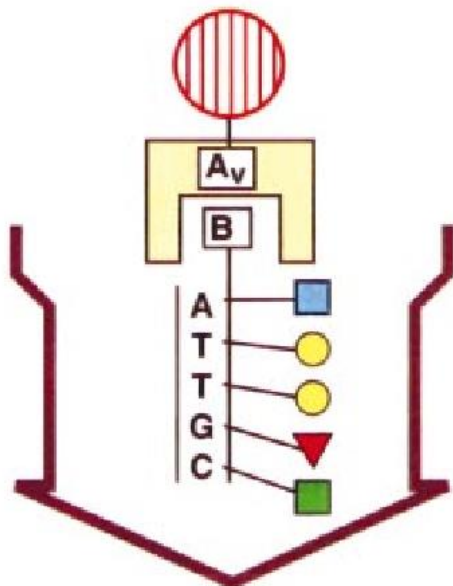
Η Αλληλούχιση Μεμονωμένου μορίου είναι μια τεχνική βασισμένη στην ανίχνευση νουκλεοτιδίων με λέιζερ και αρχικός σκοπός της ήταν η ταχεία ανάλυση αλληλουχίας θραυσμάτων γονιδιώματος 40 kb ή μεγαλύτερων με ρυθμό αλληλούχισης 100-1000 βάσεις ανά δευτερόλεπτο [103]. Πιο συγκεκριμένα η τεχνολογία αυτή βασίζεται στην ανίχνευση επισημασμένων με φθορίζουσα χρωστική νουκλεοτιδίων μέσα σε ένα ρεύμα ροής [104,105]. Στο πρώτο στάδιο της διαδικασίας επιλέγεται ένα μεμονωμένο θραύσμα πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας για να επισημανθεί με φθορίζουσα χρωστική. Η μέθοδος απαιτεί την επισήμανση κάθε μίας βάσης των νουκλεοτιδίων ενός μόνο κλώνου του θραύσματος. Κάθε τύπος νουκλεοτιδίου θα βαφεί με ένα συγκεκριμένο είδος φθορίζουσας χρωστικής που θα του προσδώσει κβαντικές αποδόσεις μεγάλου φθορισμού και διακριτές φασματικές ιδιότητες. Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί ότι μία από τις φυσικές ιδιότητες των νουκλεοτιδίων είναι ότι έχουν εγγενείς φθορίζουσες κβαντικές αποδόσεις μικρότερες από 10^{-3} bit σε συνθήκες θερμοκρασίας δωματίου [106]. Έτσι λοιπόν, για να γίνει η ταυτοποίηση τους από ανιχνευτή φθορισμού πρέπει οι φυσικές βάσεις να αντικατασταθούν με τα φθορίζοντα ανάλογα τους. Η επισήμανση της νουκλεοτιδικής αλυσίδας με φθορίζοντα ανάλογα νουκλεοτιδίων μπορεί να επιτευχθεί ενζυμικά με ενίσχυση, μέσω της διαδικασίας PCR ή με επέκταση εκκινητών [107]. Στην συνέχεια, επιλέγεται ένας μόνο κλώνος και στο 5' άκρο του προσκολλάται βιοτίνη και έτσι η αλυσίδα θα κολλήσει πάνω σε ένα επικαλυμμένο με στρεπταβιδίνη σφαιρίδιο λόγω του συμπλόκου βιοτίνης-στρεπταβιδίνης [108]. Μόλις συνδεθεί το γονιδίωμα με το σφαιρίδιο μπορεί να ξεκινήσει η αλληλούχισή του, είτε με τη μορφή διπλής έλικας είτε κατόπιν μετουσίωσης και άνοιγμα των δύο κλώνων. Η μορφή του ζητούμενου γονιδιώματος δεν έχει σημασία σε αυτήν την φάση αφού μόνο η αλυσίδα με τα επισημασμένα νουκλεοτίδια θα ανιχνευτεί [109, 110]. Η προσθήκη του ενζύμου εξωνουκλεάση 3'-5' στο 3' άκρο του επισημασμένου κλώνου θα επιφέρει την διαδοχική διάσπαση των βάσεων από το 3' προς το 5' άκρο του κλώνου. Ο ρυθμός διάσπασης μπορεί να ρυθμιστεί με μεταβολή της συγκέντρωσης εξωνουκλεάσης, της συγκέντρωσης συμπαραγόντα, της θερμοκρασίας ή με τη χρήση αναστολέων [109].

Στο στάδιο αυτό μπορεί να ξεκινήσει η ανίχνευση των επισημασμένων νουκλεοτιδίων καθώς περνάνε ένα προς ένα από την ακτίνα λέιζερ. Η ικανότητα να διακρίνεται κάθε φθορίζον μόριο στο υπόβαθρο της εικόνας προσδιορίζει το όριο ανίχνευσης του μηχανισμού λέιζερ. Η τεχνολογία ανίχνευσης έχει αλλάξει με την πάροδο του χρόνου και την εξέλιξη της μεθόδου. Αρχικά, η τεχνολογία αυτή βασιζόταν στην ανίχνευση της έκρηξης φωτονίου [111]. Αργότερα, η μέτρηση του μεμονωμένου φωτονίου συνδυάστηκε με μόνιμη διέγερση με παλμούς συχνότητας 10^{-12} sec. Αναγκαία εδώ ήταν η παρουσία σημαντικού διαλύτη Raman και Rayleigh για αυτή την τεχνική [112]. Μία άλλη εκδοχή ήθελε την εφαρμογή της επιφανειακής σκέδασης Raman [113], ενώ υπήρχε και η σκέψη ανίχνευσης των μορίων σε διάλυμα ομοεστιακής ρύθμισης [114]. Τέλος έχει περιγραφεί ανίχνευση με συσχετισμένη μέτρηση του μεγέθους έκρηξης φθορισμού ενός μορίου και του ρυθμού εκφυλισμού του φθορισμού [115].

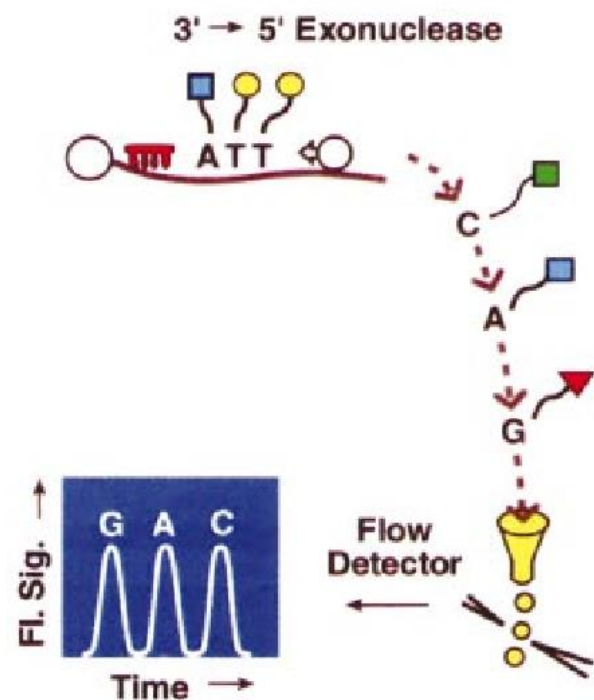
(a) **Synthesize Complementary Strand with Tagged Nucleotides**



(b) **Attach and Suspend**



C. Cleave and Detect

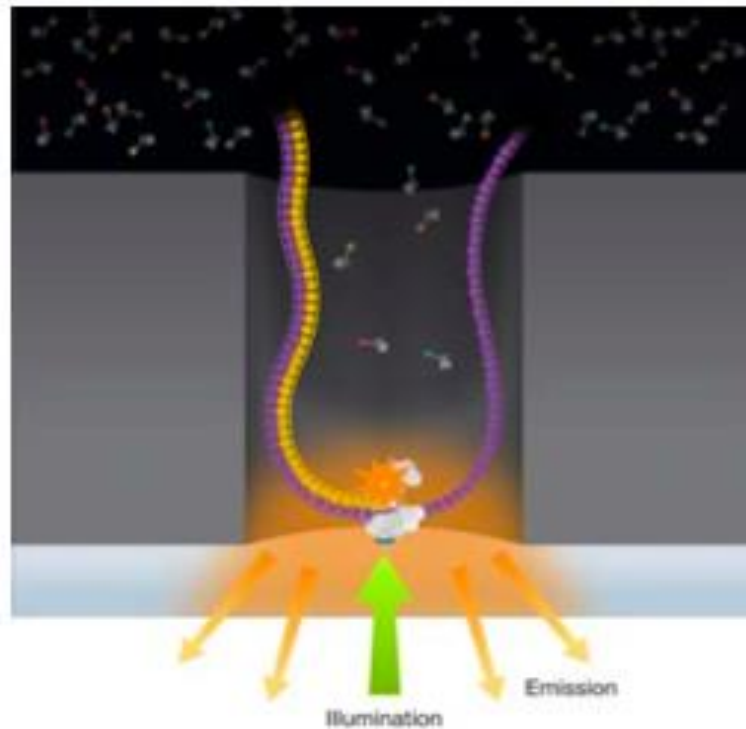


EIKONA 18: [116] Αλληλούχιση Μεμονωμένου Μορίου με Εξωνουκλεάση. α) Ένας βιοτινυλιωμένος εκκινητής υποβάλλεται στην αντίδραση επέκτασης αλυσίδας πολυμεράσης με τη χρήση τροποποιημένων dNTPs. β) Ένας κλώνος απομονώνεται από το δείγμα και τοποθετείται σε ένα σφαιρίδιο και υποβάλλεται στο δίκτυο ροής. γ) Ο προκύπτων κλώνος μετά από την πέψη με εξωνουκλεάση ανιχνεύεται μέσα από τον φθορισμό που προκύπτει από την ακτίνα λέιζερ [109].

Η τεχνολογία Αλληλούχισης Μεμονωμένου Μορίου με εξωνουκλεάση χαρακτηρίζεται από ικανότητα ανάγνωσης μεγάλων βιομορίων σε συνδυασμό με ταχύτητα. Τα μειονεκτήματα που θα μπορούσε κανείς να προσδώσει στην τεχνική αυτή έχουν να κάνουν με την ποιότητα του ρυθμιστικού διαλύματος που χρησιμοποιείται καθώς και με την ανάγκη για βελτίωση της απόδοσης τόσο της πολυμεράσης όσο και της εξωνουκλεάσης έτσι ώστε να επιτευχθούν ακόμα γρηγορότερα αποτελέσματα [108].

4.2 Αλληλούχιση Μεμονωμένου Μορίου σε Πραγματικό Χρόνο

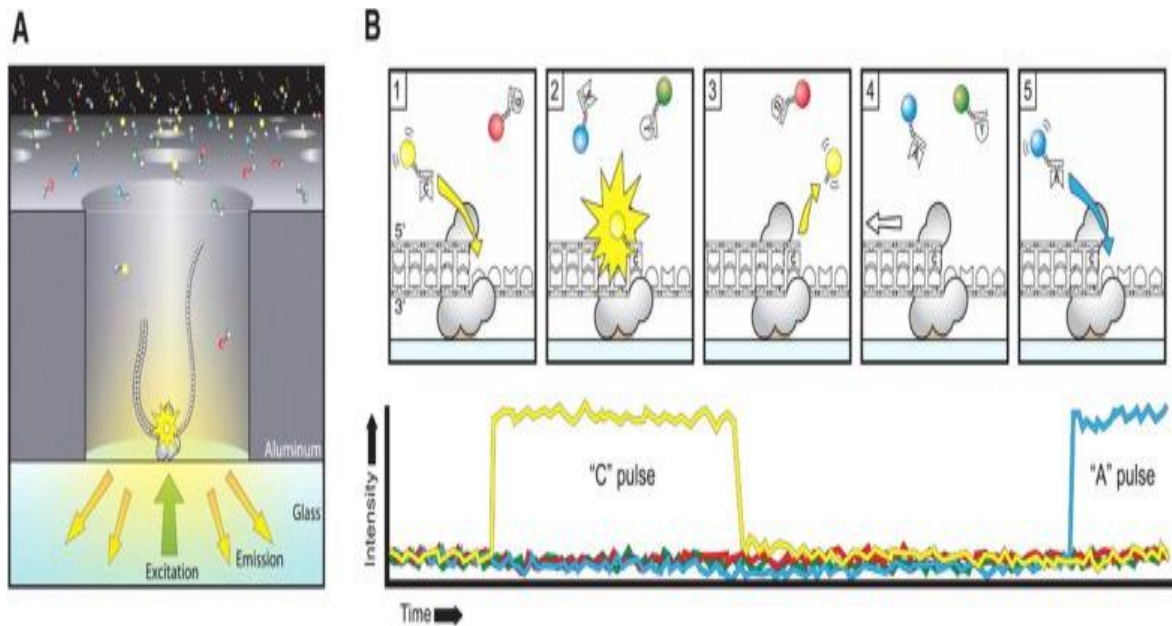
Η τεχνολογία που ξεχωρίζει μεταξύ αυτών των νέων γενιών αλληλούχισης είναι η Αλληλούχιση Μεμονωμένου Μορίου σε Πραγματικό Χρόνο. Η μέθοδος αυτή είναι εμπορικό προϊόν της εταιρείας Pacific Biosciences [46]. Για την εφαρμογή της τεχνικής αυτής απαραίτητο εργαλείο είναι οι Κυματοδηγοί Μηδενικής Κίνησης “Zero Mode Waveguides” (“ZMWs”). Πρόκειται για συστοιχίες μικρών δομημένων νανοδομών, οι οποίες στην ουσία είναι μικροσκοπικές οπές σε ένα μεταλλικό φιλμ επικολλημένες σε ένα κύκλωμα. Οι οπές αυτές εκμεταλλεύονται τις ιδιότητες του φωτός, καθώς έχουν άνοιγμα με διάμετρο μικρότερη από το μήκος κύματος του φωτός, και έτσι το αποτέλεσμα είναι η ακτίνα φωτός να εκφυλίζεται εκθετικά φωτίζοντας αποκλειστικά τον πυθμένα του πηγαδιού. Με αυτόν τον τρόπο γίνεται δυνατή η απεικόνιση των επισημασμένων με φθοριούχο χρώση μορίων μόνο στον πυθμένα της οπής αφού η ζώνη διέγερσης του λέιζερ είναι εξαιρετικά στοχευμένη [117]. *Βλέπε Εικ. 19*



EIKONA 19: Zero-mode Waveguide. Ένα πηγαδάκι με διάμετρο δεκάδων νανόμετρων, μικρότερο από το μήκος κύματος του χρησιμοποιούμενου φωτός. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα να συσσωρεύεται το φως στον πυθμένα της οπής. Παρέχει ένα παράθυρο παρακολούθησης της DNA πολυμεράσης την ώρα επέκτασης πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας [118].

Ξεκινώντας την διαδικασία, ένα μόριο DNA πολυμεράσης στερεώνεται στον πυθμένα κάθε πηγαδιού χρησιμοποιώντας τον δεσμό βιοτίνης και στρεπταβιδίνης. Μόλις ενσωματωθεί το πρότυπο θραύσμα γονιδιώματος προστίθενται δεοξυρυβονουκλεοτίδια επισημασμένα με φθορίζουσα χρωστική. Να σημειωθεί εδώ ότι κάθε είδος δεοξυρυβονουκλεοτιδίου είναι επισημασμένο με διαφορετική χρωστική. Ξεκινάει ο πολυμερισμός ενώ τα φθορίζοντα dNTPs κινούνται στον χώρο. Ενώ το φθορίζον σήμα των dNTPs δεν χάνεται, το ειδικό σύστημα ανίχνευσης, λόγω της κατασκευής του φρεατίου, καταγράφει μόνο τον φθορισμό του νουκλεοτιδίου που ενσωματώνεται στον αναπτυσσόμενο κλώνο. Η ανάγνωση της αλληλουχίας σε πραγματικό χρόνο επιτυγχάνεται καθώς όταν σταματάει η επέκταση της αλυσίδας σταματά και η εκπομπή φωτός, αφού η φθορίζουσα βαφή είναι ενσωματωμένη με την φωσφορική του ομάδα.

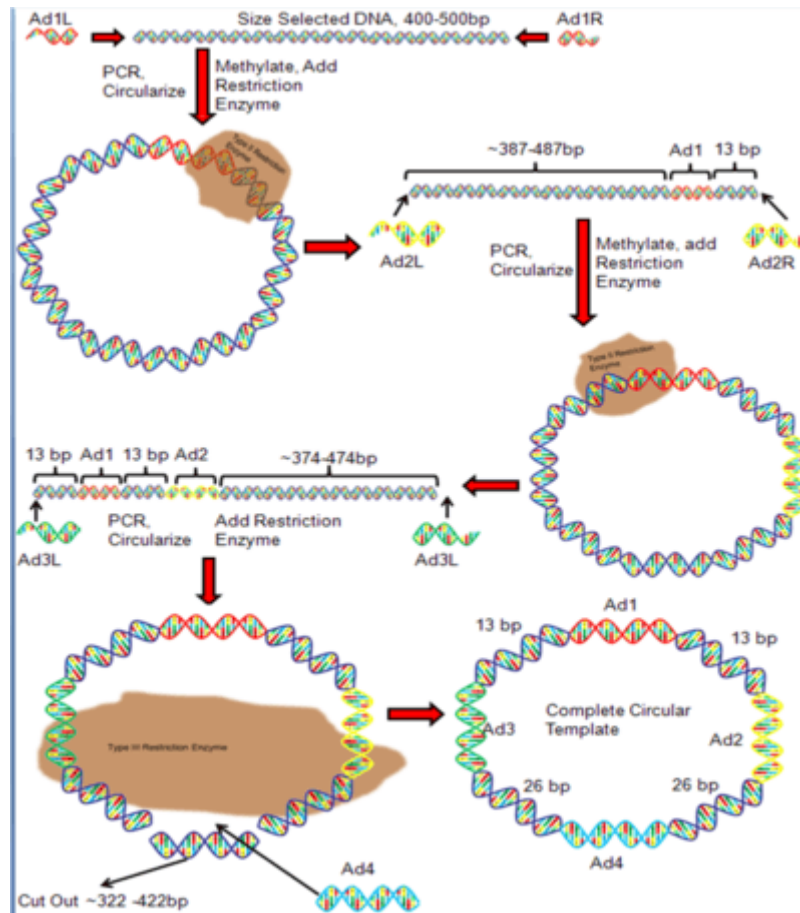
Έτσι, κατά τη σύνθεση του δεύτερου κλώνου κάθε νέα ενσωμάτωση νουκλεοτιδίων μετρίεται με ανίχνευση της εκπομπής φωτός. Η ακρίβεια της μεθόδου φτάνει το 99,3% και το μήκος ανάγνωσης αλληλουχιών ξεπερνά τα 900bp [119]. Βλέπε *Εικ. 20*



ΕΙΚΟΝΑ 20: Αλληλούχηση Μεμονωμένου Μορίου σε Πραγματικό Χρόνο. Α) Η DNA πολυμεράση προσαρμόζεται στον πυθμένα του πηγαδιού και το θραύσμα γονιδιώματος ενσωματώνεται. Β) Καθένα από τα τέσσερα dNTPs επισημαίνεται με διαφορετική φθορίζουσα χρωστική ουσία (υποδεικνυόμενη με κόκκινο, κίτρινο, πράσινο και μπλε, αντίστοιχα για G, C, T και A) έτσι ώστε να έχουν ξεχωριστά φάσματα εκπομπής. Με την ενσωμάτωση κάθε νουκλεοτιδίου στην αλυσίδα παράγεται ένας παλμός που καθορίζει την βάση. 1) Ένα σημασμένο με φθορισμό νουκλεοτίδιο συνδέεται με το πρότυπο γονιδίωμα στην ενεργό θέση της πολυμεράσης. 2) Η εκπομπή χρώματος συγχέεται με την ενσωματωμένη βάση (κίτρινο για C). 3) Το προϊόν της χρωστικής διασπάται από το νουκλεοτίδιο και διαχέεται έξω από το πηγαδάκι και έτσι ολοκληρώνεται ο παλμός φθορισμού. 4) Η πολυμεράση μετακινείται στην επόμενη θέση. 5) Το επόμενο νουκλεοτίδιο συνδέεται με το υπό αλληλούχηση γονιδίωμα στην ενεργό θέση της πολυμεράσης, αρχίζοντας τον επόμενο παλμό φθορισμού, ο οποίος αντιστοιχεί στη βάση A εδώ [120].

4.3 DNA Nanoball Sequencing

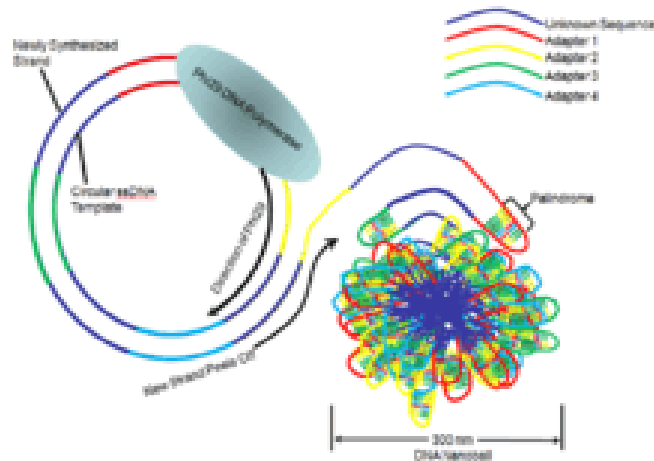
Η τεχνολογία Αλληλούχισης με την χρήση Νανοσφαιριδίου δημιουργήθηκε από τους Σέρβους επιστήμονες που σχεδίασαν την Αλληλούχιση με Υβριδοποίηση [121]. Οι δυνατότητες αυτής της τεχνικής φτάνουν στην αλληλούχιση ολόκληρου του ανθρώπινου γονιδιώματος και το χαρακτηριστικό της είναι ότι χρησιμοποιεί το βακτηριακό μοντέλο κυκλικής αντιγραφής ώστε να συμπτύξει το γονιδίωμα σε νανοσφαιρίδια, σφαιρίδια δηλαδή διαμέτρου 10^{-12} m.. Αρχικά, το DNA που προορίζεται για αλληλούχιση «κόβεται» σε θραύσματα με συγκεκριμένο επιθυμητό μέγεθος της τάξης των 400-500 bp. Τα θραύσματα αυτά γίνονται μονόκλινα και το επόμενο βήμα είναι η ενσωμάτωση των προσαρμογέων στην αλυσίδα. Συνολικά χρησιμοποιούνται τέσσερις προσαρμογείς οι οποίοι αρχικά είναι χωρισμένοι στην μέση. Τα δύο μισά του πρώτου προσαρμογέα συνδέονται στα δύο άκρα του κλώνου και υπόκεινται στην διαδικασία της PCR για να ενισχυθεί. Έπειτα τα δύο άκρα τροποποιούνται χημικά έτσι ώστε να ενωθούν τα δύο μέρη μεταξύ τους και να δημιουργηθεί ένα κυκλικό μόριο DNA. Η προσθήκη του ενζύμου περιοριστική ενδονουκλεάση χρησιμοποιείται για να «κόψει» το κυκλικό γονιδίωμα στη συγκεκριμένη θέση που αυτή αναγνωρίζει. Με αυτό τον τρόπο δημιουργείται μια αλυσίδα που είναι έτοιμη να προσλάβει τους επόμενους προσαρμογείς- κάθε έναν σε διαφορετική θέση- με τον ίδιο τρόπο [122]. *Βλέπε Εικ. 21*



ΕΙΚΟΝΑ 21: Αλληλούχιση με Νανοσφαιρίδιο. Ενσωμάτωση των προσαρμογέων στον κλώνο του γονιδιώματος. Μετά από κάθε ενσωμάτωση ο κλώνος γίνεται κυκλικός με χημική τροποποίηση και ενισχύεται με PCR. Συνολικά ενσωματώνονται τέσσερις προσαρμογείς σε διαφορετικές θέσεις μέσα στον κλώνο [123].

Το πλήρες κυκλικό DNA στη συνέχεια ενισχύεται με μια μακρά σειρά DNA μέσω κυκλικού κυλινδρικού αναδιπλασιασμού χρησιμοποιώντας το ένζυμο Phi29 DNA πολυμεράση. Το πρότυπο κυκλικό DNA διαχωρίζεται από το νεοσυντιθέμενο και έτσι δημιουργείται ένα ανεξάρτητο μακροσκελές DNA από αντίγραφο του πρότυπου DNA. Οι τέσσερις ακολουθίες προσαρμογέων περιέχουν παλίνδρομες αλληλουχίες, οι οποίες αλληλεπιδρούν (καθώς είναι συμπληρωματικές) και προκαλούν περιστροφή του μακροσκελούς DNA. Έτσι δημιουργείται μια σφιχτή σφαίρα DNA, περίπου 300 nm σε μέγεθος. Κάθε σφαίρα (νανοσφαίρα) παραμένει διαχωρισμένη από τις υπόλοιπες για να μην εμπλακούν με τον υπόλοιπο κλώνο DNA [122]. Βλέπε *Εικ 22* Στην συνέχεια της διαδικασίας, κάθε νανοσφαίρα τοποθετείται σε πηγαδάκια διατεταγμένα σε μια κυψελίδα ροής.

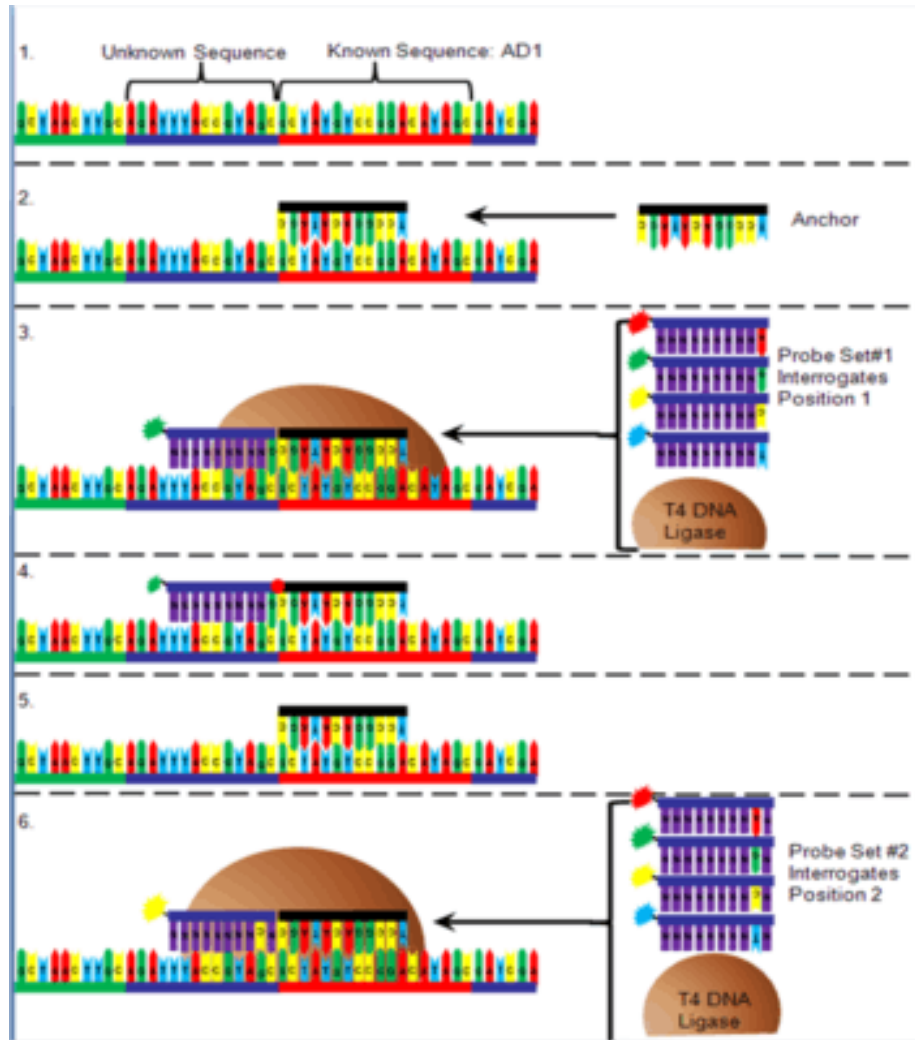
Κάθε πηγαδάκι είναι σχεδιασμένο ώστε να χωράει μία σφαίρα DNA για να αποδίδεται η μεγαλύτερη πυκνότητα. Η αλληλούχιση ξεκινάει και οι βάσεις διαβάζονται με κατεύθυνση 5' προς 3' σε σχέση με τον κάθε προσαρμογέα. Σημειώνεται ότι διαβάζονται λίγες βάσεις- περίπου δέκα- μετά από κάθε προσαρμογέα.



ΕΙΚΟΝΑ 22: Αλληλούχιση με Νανόςφαιρα. Απεικονίζεται ο κυκλικός κυλινδρικός αναδιπλασιασμός του γονιδιώματος με την βοήθεια του ενζύμου Phi29 DNA πολυμεράση. Το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία της DNA νανοσφαίρας [124].

Τελικά, η σειρά της αλληλουχίας θα προσδιοριστεί με τα εξής βήματα: Αρχικά, στα νανοσφαιρίδια ενσωματώνεται ανιχνευτής συμπληρωματικός με έναν προσαρμογέα. Προστίθεται στη συνέχεια ένα μίγμα τεσσάρων ανιχνευτών επισημασμένων με φθορίζουσα χρωστική. Σημειώνεται ότι η χρωστική είναι διαφορετική για κάθε έναν από αυτούς και ότι στην αλληλουχία τους όλες οι θέσεις εκτός από μία είναι εκφυλισμένες. Κατά την υβριδοποίηση θα συνδεθεί ο εκφυλισμένος ανιχνευτής –μέσω της μιας θέσης του- μαζί με τον ανιχνευτή από τα νανοσφαιρίδια. Μέσω της σύνδεσης παράγεται φθορίζον σήμα το οποίο και δηλώνει την αλληλουχία. Οι μη συνδεδεμένοι ανιχνευτές απομακρύνονται. Τέλος, οι δεσμευμένοι ανιχνευτές αποσύρονται και ένα καινούργιο μείγμα επισημασμένων ανιχνευτών εισέρχεται με διαφορετική θέση υβριδοποίησης. Η διαδικασία αυτή θα επαναληφθεί για όλες τις δέκα θέσεις δίπλα στον κάθε προσαρμογέα και τέλος θα επαναληφθεί για όλα τα άκρα κάθε προσαρμογέα. Το πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής αφορά τα μεγέθη μορίων που μπορεί να αλληλουχίσει καθώς διαθέτει συστοιχία υψηλής πυκνότητας.

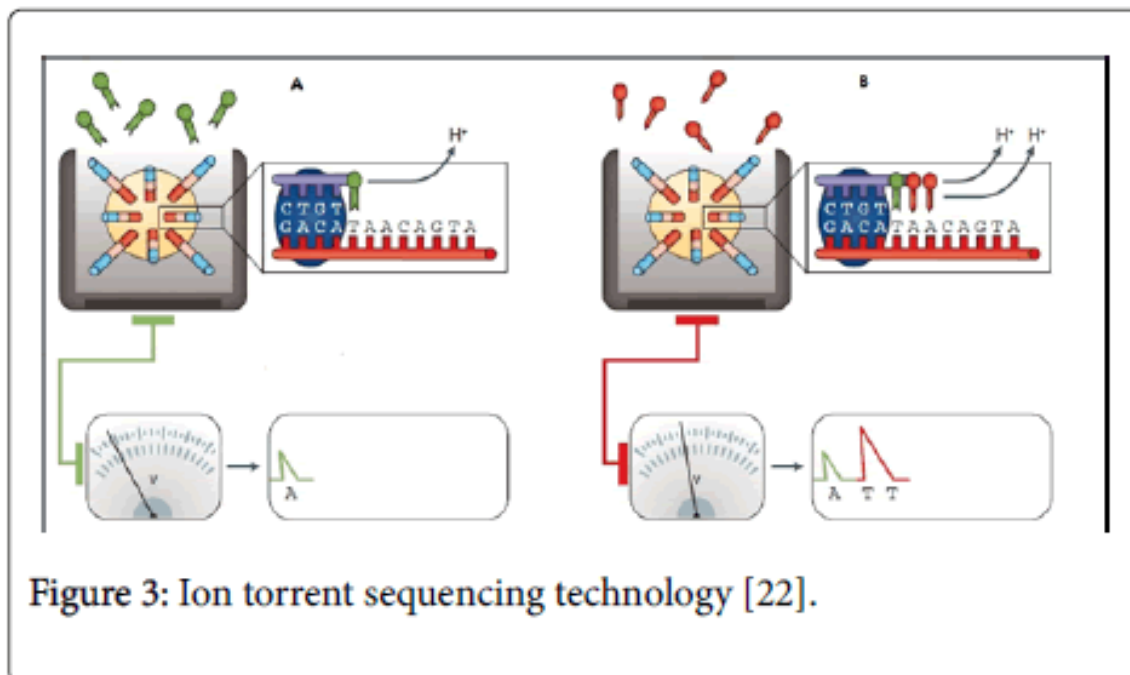
Με την τεχνολογία αυτή έχει αλληλουχισθεί ολόκληρο το ανθρώπινο γονιδίωμα. Απαιτούμενο κόστος των αντιδραστηρίων για την αλληλούχιση ολόκληρου του ανθρώπινου γονιδιώματος άγγιζε τα 5000 \$ [47]. Βλέπε *Εικ. 23*



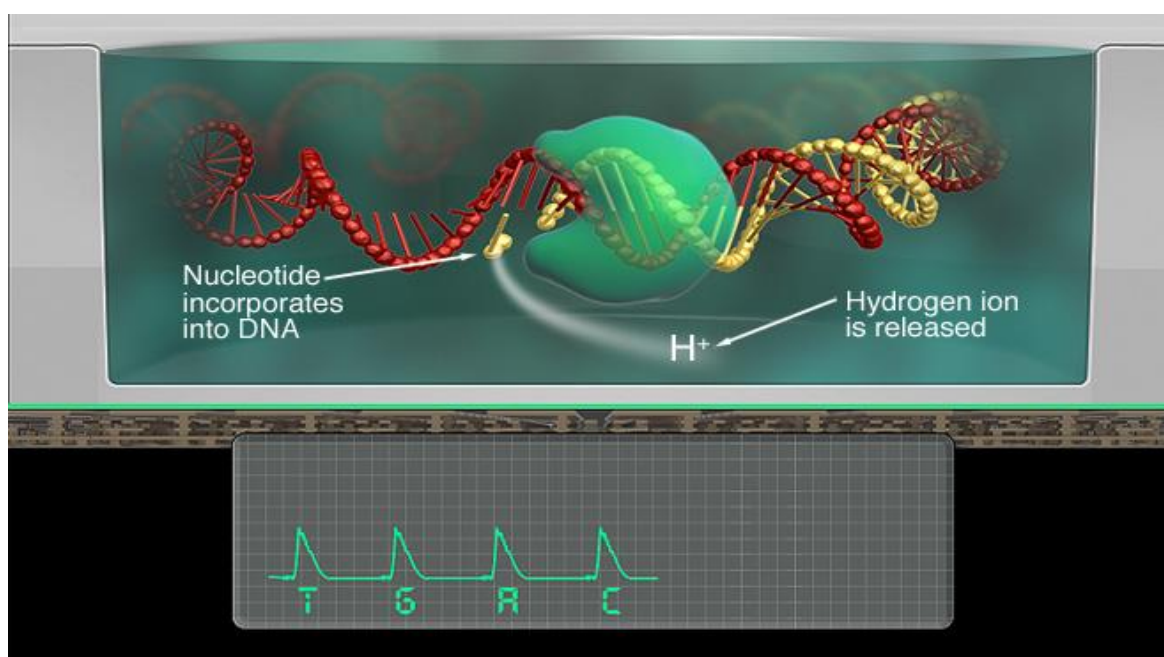
ΕΙΚΟΝΑ 23: Αλληλούχιση με Νανοσφαίρα. Πρώτον ενσωματώνεται ανιχνευτής στο νανοσφαιρίδιο που είναι συμπληρωματικός είτε στο δεξιό είτε στο αριστερό άκρο ενός από τους προσαρμογείς. Δεύτερον προστίθεται μείγμα επισημασμένων ανιχνευτών μαζί με DNA λιγάση η οποία θα τους συνδέσει με τον ανιχνευτή της νανοσφαίρας. Οι επισημασμένοι ανιχνευτές έχουν μια θέση συμπληρωματική με την ζητούμενη πρότυπη βάση. Από την σύνδεση τους εκπέμπεται φθορίζον φως. Στο τέλος αποσύρονται ο φθορίζον εκκινητής που χρησιμοποιήθηκε καθώς και ο εκκινητής της νανοσφαίρας έτσι ώστε να ξεκινήσει ένας νέος κύκλος [125].

4.4 Ion torrent

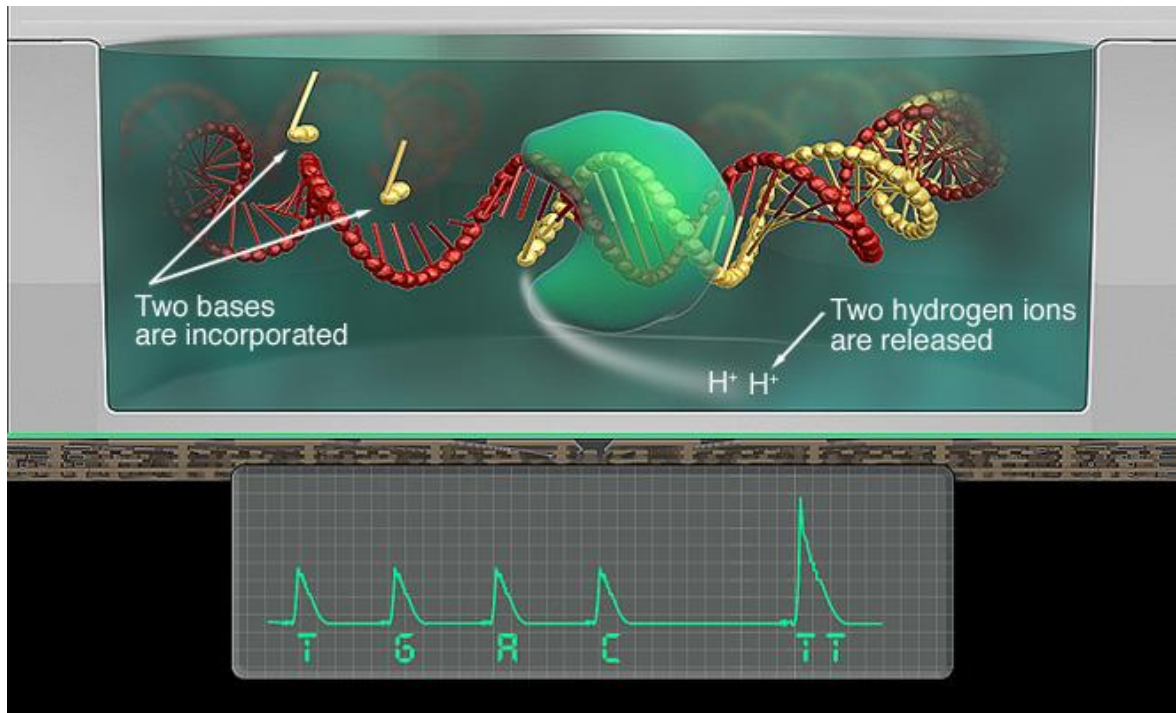
Η τεχνολογία Ion Torrent ανήκει σε αυτές της τελευταίας γενιάς και το χαρακτηριστικό της είναι ότι παίρνει την χημική πληροφορία των νουκλεοτιδικών βάσεων και την μετατρέπει σε ψηφιακή πληροφορία [126]. Την μέθοδο αυτή ανέπτυξαν οι επιστήμονες που ανέπτυξαν και την 454 Αλληλούχιση και έγινε εμπορικό προϊόν της εταιρείας Life Technologies [49]. Η βιβλιοθήκη των δειγμάτων προετοιμάζεται με τον ίδιο τρόπο όπως στην μέθοδο Pyrosequencing. Η διαφορά έρχεται στο γεγονός ότι αντί για ενσωμάτωση σε μικροσκοπική συστοιχία φρεατίων (Pico Titer Plate), στην τεχνολογία Ion Torrent έχουμε ενσωμάτωση των μορίων σε ένα chip ημιαγωγών ο οποίος είναι ικανός να ανιχνεύει μεμονωμένα πρωτόνια. Τα σφαιρίδια στα οποία έχει ενσωματωθεί το υπό αλληλούχιση γονιδίωμα εισέρχονται στα πηγαδάκια του ανιχνευτή. Κάθε σφαιρίδιο σε ένα ξεχωριστό πηγαδάκι. Ξεκινάει η αλληλούχιση με το μηχάνημα ανιχνευτή να βρίσκεται στο πεδίο των ημιαγωγών chip και μείγμα δεοξυρυβονουκλεοτιδίων να προστίθεται. Η ενσωμάτωση των νουκλεοτιδίων απελευθερώνει το ιόντα υδρογόνου (H^+) που αλλάζουν το pH του διαλύματος στο περιβάλλον, με τρόπο ανάλογο με τον αριθμό των ενσωματωμένων νουκλεοτιδίων. Η αλλαγή αυτή εντοπίζεται στον πυθμένα κάθε πηγαδιού από τον ανιχνευτή [47]. Σημειώνεται σε αυτό το σημείο ότι το ευαίσθητο αυτό σύστημα ανίχνευσης δεν έχει κάμερα, ούτε φως, η ανίχνευση γίνεται άμεσα και κάθε ενσωμάτωση νουκλεοτιδίων καταγράφεται μέσα σε δευτερόλεπτα. Ο ημιαγωγός αυτός δημιουργεί μια άμεση σύνδεση μεταξύ των χημικών δεδομένων και των ψηφιακών με αποτέλεσμα την γρήγορη και απλή λύση της αλληλούχισης πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας [126]. *Βλέπε Εικ. 24,25,26*



ΕΙΚΟΝΑ 24: Αλληλούχιση Ion Torrent. Με την τεχνολογία αυτή μπορεί να αλληλουχηθούν μόρια μήκους από 200 bp έως και 10Gb. Το μήκος των αλληλουχιών που μπορεί να διαβάσει σε συνδυασμό με τον χρόνο αλληλούχισης (δύο έως οχτώ ώρες) αποτελούν τα πλεονεκτήματα της μεθόδου. Το μειονέκτημα της τεχνικής αυτής έχει να κάνει με τα ομοπολυμερή [127].



ΕΙΚΟΝΑ 25: Αλληλούχιση Ion Torrent. Η τεχνολογία αυτή λειτουργεί ως εξής: όταν για παράδειγμα, ένα νουκλεοτίδιο με βάση C ενσωματωθεί στον κλώνο DNA θα απελευθερωθεί ένα κατιόν υδρογόνου. Το φορτίο από αυτό το ιόν θα αλλάξει το pH του διαλύματος, το οποίο μπορεί να ανιχνευθεί από τον αισθητήρα ιόντων. Τέλος, ο αναλυτής αλληλουχίας ουσιαστικά ο μικρότερος μετρητής pH σε στερεά κατάσταση, θα «καλέσει» τη βάση, μετατρέποντας απευθείας τις χημικές πληροφορίες σε ψηφιακές πληροφορίες [128].

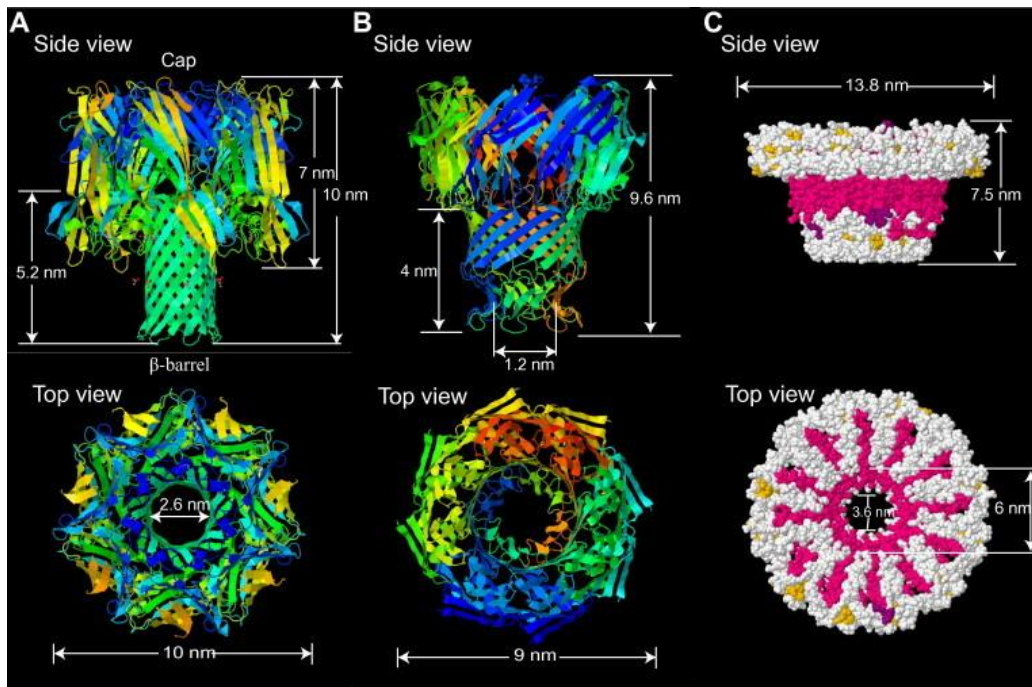


ΕΙΚΟΝΑ 26: Εάν υπάρχουν δύο ταυτόσημες βάσεις -ομοπολυμερή- στον κλώνο DNA, η τάση θα είναι διπλή και ο ανιχνευτής θα καταγράψει δύο ταυτόσημες βάσεις. Επειδή πρόκειται για άμεση ανίχνευση - χωρίς σάρωση, χωρίς κάμερες, χωρίς φως - κάθε ενσωμάτωση νουκλεοτιδίων καταγράφεται σε δευτερόλεπτα [128].

4.4 Αλληλούχιση με Νανοπόρους

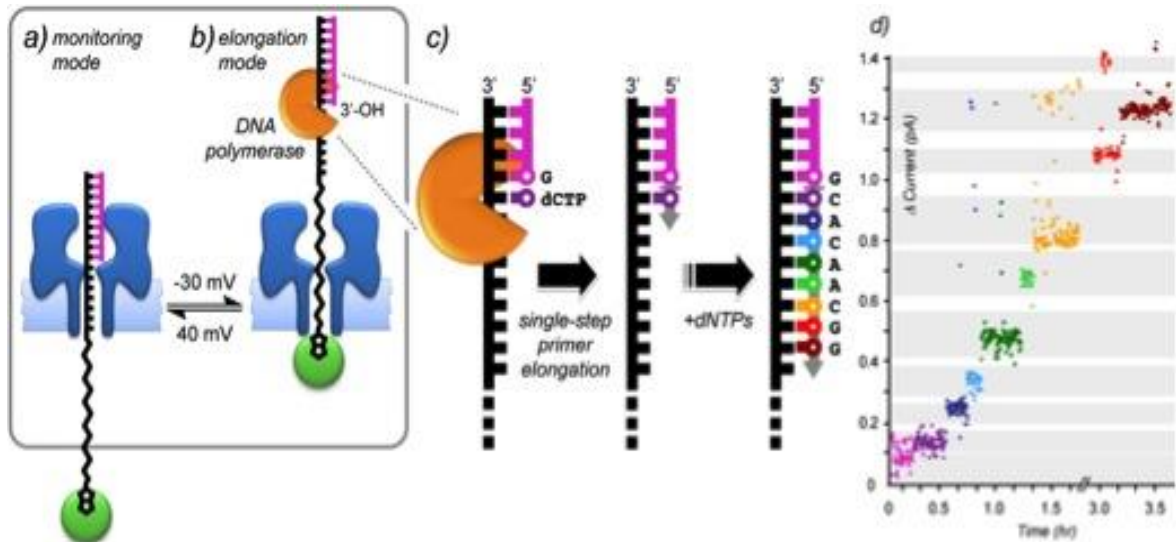
Μετά από τρεις γενιές τεχνολογιών αλληλούχισης, έρχεται η τελευταία και πιο εξελιγμένη τεχνική αλληλούχισης που βασίζεται στους «νανοπόρους». Πολλοί επιστήμονες πιστεύουν πως με αυτήν εγκαινιάζεται η τέταρτη γενιά αλληλούχισης καθώς δεν φέρει καμία ομοιότητα με τις προηγούμενες μεθόδους. Πλέον, δεν απαιτείται παρασκευή και προετοιμασία των δειγμάτων προς αλληλούχιση, ούτε καταβολή τεράστιων χρηματικών ποσών για την διεξαγωγή των τεχνολογιών αυτών. Παρόλο που πρόκειται για μια μέθοδο των τελευταίων χρόνων, η ιδέα για αλληλούχιση με χρήση νανοπόρων γεννήθηκε την δεκαετία του 1990 από τους Church, Deamer και Akesson οι οποίοι πρότειναν ότι είναι δυνατή η αλληλουχία του DNA χρησιμοποιώντας αισθητήρες νανοπόρων [129,130]. Χαρακτηρίζεται μία από τις πιο ισχυρές τεχνολογίες προσδιορισμού αλληλουχίας. Τα σημαντικά πλεονεκτήματα των νανοπορων περιλαμβάνουν «καθαρά» μόρια χωρίς ενσωμάτωση χρωστικών ουσιών, τις εξαιρετικά μεγάλου μήκους αναγνώσεις που φτάνουν τις 10^4 - 10^6 βάσεις, την υψηλή απόδοση και τέλος τις χαμηλές απαιτήσεις σε υλικά [131].

Η μέθοδος με νανοπόρους βασίζεται στο ότι η αγωγιμότητα του πόρου για τα ρεύματα ιόντων μεταβάλλεται όταν ο πόρος έχει αποκλειστεί από τον κλώνο του νουκλεϊκού οξέος που διέρχεται μέσα από αυτόν. Η ροή του ρεύματος ιόντος βασίζεται στην μετατόπιση του μορίου μέσα στον πόρο [47]. Έρευνα το 1996 έδειξε ότι ένας α-HL διάυλος ενσωματωμένος σε επίπεδες διπλοστοιβάδες φωσφολιπιδίων έχει την ικανότητα να ανιχνεύει ηλεκτρικά μεμονωμένα μονόκλινα μόρια ssDNA και ssRNA. Με την εξέλιξη των ερευνών βρέθηκε ότι ο διάυλος α-HL με προσαρμογέα ομοιοπολικά συνδεδεμένο μαζί του μπορεί να αναγνωρίζει συνεχώς μη επισημασμένα μεμονωμένα νουκλεοτίδια (dAMP, dCMP, dGMP και dTMP) μέσω μετρήσεων αντιστατικού ρεύματος με βάση το νανοπόρο [132]. Μία άλλη τεχνική αλληλούχισης με νανοπόρο χρησιμοποιεί νανοπόρο τύπου MspA που διαθέτει περίμετρο πλάτους 1,2 nm και 0,6-nm. Προσδίδει υψηλή αναλογία σήματος και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διάκριση των νουκλεοτιδίων του μονόκλωνου ssDNA [133]. *Βλέπε Εικ. 27*



ΕΙΚΟΝΑ 27: Αλληλούχιση με νανοπόρους. Στην εικόνα φαίνονται οι διάφοροι τύποι βιολογικών νανοπόρων [134]. Α. Επταμερική α -αιμολυσίνη τοξίνη από *Staphylococcus aureus* [135]. Β. Οκταμερική MspA πορίνη από *Mycobacterium smegmatis* [136]. Γ. Διαύλου σύνδεσης Dodecamer από κινητήρα συσκευασίας DNA βακτηριοφάγου ρhi29 [137].

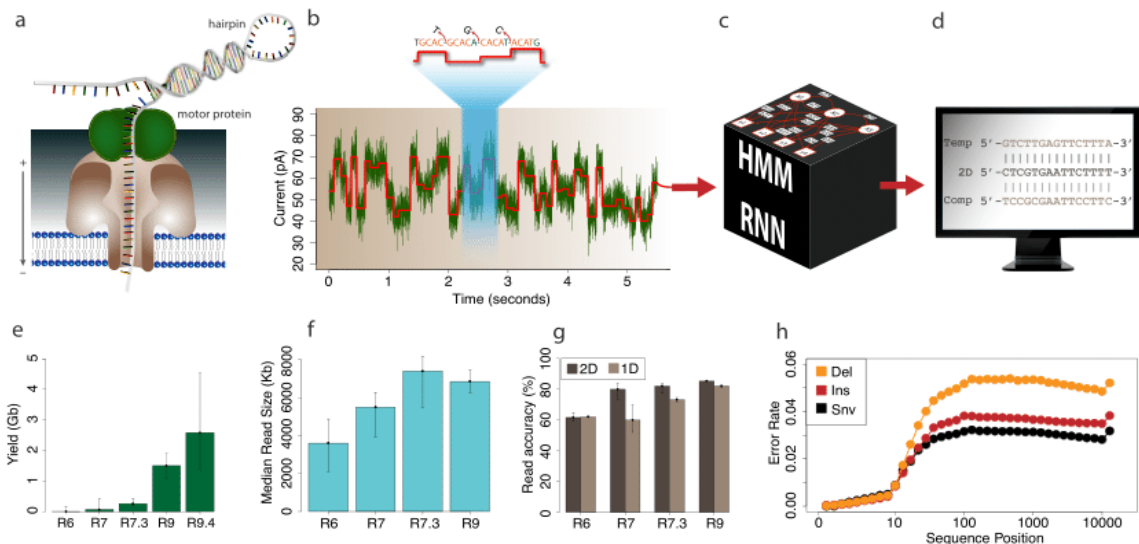
Πιο συγκεκριμένα, τα ιόντα ηλεκτρολύτη στο διάλυμα μετακινούνται διαμέσου του πόρου ηλεκτροφορητικά κάτω από μια προκαθορισμένη τάση, δημιουργώντας έτσι ένα σήμα ιοντικού ρεύματος. Όταν στο διάλυμα θα προστεθεί ένα μόριο, όπως ένα αρνητικά φορτισμένο μόριο DNA, το ρεύμα που ρέει διαμέσου του νανοπόρου θα αποκλειστεί, διακόπτοντας το μεταδιδόμενο σήμα. Οι φυσικές και χημικές ιδιότητες των μορίων στόχων μπορούν να υπολογιστούν με την στατιστική ανάλυση του εύρους και της διάρκειας των ρευμάτων [138]. Κάθε νουκλεοτίδιο παρέχει μία μοναδική ηλεκτρική υπογραφή που καθορίζεται από τις ιδιότητες προσανατολισμού και φορτίου [131]. Βλέπε *Εικ. 28*



ΕΙΚΟΝΑ 28: Διαδικασία αλληλούχισης με νανοπόρους και απεικόνιση του σήματος των ιοντικών ρευμάτων [139].

Η ολοκλήρωση αυτής της μεθόδου χρήζει εξέλιξης και τελειοποίησης σε αρκετά σημεία. Αρχικά το πάχος του ενσωματωμένου ηλεκτροδίου πρέπει να είναι συγκρίσιμο με το μέγεθος των βάσεων έτσι ώστε αυτές να το διαπερνούν μέσα από τους πόρους [140]. Επιπλέον, η συσκευή αλληλούχισης πρέπει να μπορεί να ελέγχει τον προσανατολισμό και τη θέση κάθε βάσης μεταξύ των μεταλλικών ηλεκτροδίων καθώς το ρεύμα σήραγγας είναι εκθετικά ευαίσθητο στις μεταβολές του προσανατολισμού και της απόστασης της ατομικής κλίμακας [141]. Τέλος, η μονόδρομη μετατόπιση πρέπει να ελέγχεται έτσι ώστε κάθε νουκλεοβάση να παραμένει μεταξύ των ανιχνευτών σήραγγας για τουλάχιστον 0,1 ms για να δειγματοληψία [136].

Η αλληλούχιση με νανοπόρους έγινε εμπορικό προϊόν της εταιρείας Oxford Nanopore Technologies (ONT) η οποία ιδρύθηκε από τους Hagan Bayley και Gordon Sanghera. Η εταιρεία αυτή έχει δημιουργήσει το σύστημα GridION το οποίο έχει σχεδιαστεί για ευέλικτους χρόνους λειτουργίας που κυμαίνονται από λίγα λεπτά έως μερικές ημέρες ανάλογα με τις απαιτήσεις δεδομένων των πειραμάτων [142].



EIKONA 29: Αλληλούχιση Oxford Nanopore [143]. Η κινητήρια πρωτεΐνη ξετυλίγει το dsDNA επιτρέποντας στο ssDNA να περάσει μέσα από τον πόρο, ενώ ένας αισθητήρας μετρά μετατοπίσεις ιοντικού ρεύματος (a) με σταθερή συχνότητα δειγματοληψίας ~5000 Hz. Τα πρώτα σήματα ιοντικού ρεύματος χωρίζονται σε διακριτές ομάδες που συνοψίζονται με τη μέση τιμή, το SD και το μήκος. (b) τα κατακερματισμένα σήματα αναλύονται μέσω υπολογιστή C) που εξαγάγει την ακολουθία των προτύπων και των συμπληρωματικών σημάτων. Τα πάνελ e, f και g δείχνουν την εξέλιξη της απόδοσης της χημείας της Oxford Nanopore Technologies για τη διακίνηση, το μήκος ανάγνωσης και την ακρίβεια. Ο πίνακας h δείχνει το ποσοστό σφάλματος ακολουθίας ως συνάρτηση της θέσης ανάγνωσης [144].

Η πρωτοπόρος στην τεχνολογία αλληλούχισης εταιρεία δημιούργησε, τον Νοέμβριο του 2013, μια συσκευή προσδιορισμού ακολουθίας DNA μιας χρήσης, σε μέγεθος μιας ράβδου μνήμης USB, το οποίο έχει σχεδιαστεί για γενικές εφαρμογές της αλληλουχίας του DNA. Το μέσο μήκος ανάγνωσης του MinION είναι περίπου 5,4 kb έως 10 kb το οποίο είναι πολύ μεγαλύτερο από τα μέσα μήκη ανάγνωσης άλλων τεχνολογιών προσδιορισμού ακολουθίας DNA [145]. Τα αποτελέσματα χρήσης του συστήματος MinION φέρουν σημαντικά ποσοστά σφάλματος. Το γεγονός αυτό δεν είναι αποθαρρυντικό για την εξέλιξη της αλληλούχισης που βασίζεται σε νανοπόρους [146]. *Βλέπε Eικ. 30*



ΕΙΚΟΝΑ 30: Αλληλούχηση με Νανοπόρους. Το φορητό MinION - ο πρώτος φορητός αναλυτής DNA nanopore [147].

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Το DNA (και σε ορισμένες περιπτώσεις το RNA) αποτελεί το γενετικό υλικό των περισσότερων οργανισμών και περιέχει τις γενετικές πληροφορίες που καθορίζουν τα χαρακτηριστικά κάθε οργανισμού. Από την ανακάλυψη της στερεοδομής του από τους Watson & Crick, το ενδιαφέρον των ερευνητών επικεντρώθηκε στη μελέτη της βασικής δομικής μονάδας των νουκλεϊνικών οξέων, το νουκλεοτίδιο. Σε μικρό χρονικό διάστημα ο στόχος πολλών ερευνών ήταν η ανάλυση της αλληλουχίας του DNA/RNA καθώς αυτή ευθυγραμμίζεται με την αλληλουχία των αμινοξέων στις πρωτεΐνες, αλλά επίσης θα μπορούσε να αποκαλύψει τη λειτουργία πολλών γονιδίων.

Αρχικά, η προσπάθεια για αλληλούχιση επικεντρώθηκε στους εύκολους στόχους των βιολογικών ερευνών, σε μικρής έκτασης γονιδιώματα (πληθυσμοί RNA - μικροβιακό ριβοσωμικό, μεταφορικό RNA, RNA βακτηριοφάγοι). Η ανάγκη της επιστημονικής κοινότητας για αλληλούχιση μεγαλύτερων και πιο περίπλοκων μορίων οδήγησε τον Fred Sanger στην δημιουργία της μεθόδου «Τερματισμού της Αλυσίδας», η οποία με την απλότητα και την ακρίβειά της έγινε κυρίαρχος στην αλληλούχιση βιομορίων. Στην συνέχεια, αναζητώντας το καλύτερο δυνατό αποτέλεσμα οι ερευνητές πραγματοποιούν πολλές αντιδράσεις αλληλούχισης ταυτόχρονα, με την χρήση νέων εξελιγμένων μηχανών, καθώς επίσης αποφεύγουν την χρήση «βαριών» ουσιών όπως είναι τα ραδιοσημασμένα νουκλεοτίδια. Στόχος αυτή την φορά είναι η μεγαλύτερη ταχύτητα καθώς και το χαμηλότερο κόστος αλληλούχισης. Τέλος, γίνεται προσπάθεια για αλληλούχιση μεμονωμένων μορίων. Έτσι αποφεύγεται η προετοιμασία και η ενίσχυση των δειγμάτων με αποτέλεσμα την ακόμα μεγαλύτερη μείωση του κόστους του χρόνου αλλά και των σφαλμάτων. Μέσα από τις διάφορες τεχνικές που επινοήθηκαν γίνεται κατανοητή η διαφορετική οπτική γωνία κάθε επιστήμονα που ασχολήθηκε με την αλληλούχιση βιομορίων, καθώς και τα διαφορετικά μέσα και γνώσεις που είχαν σε κάθε χρονική στιγμή.

Η τόσο μεγάλη εξέλιξη της μεθόδου κατά την διάρκεια αυτών των χρόνων δηλώνει το πόσο σημαντική είναι η αλληλουχία μιας πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας. Οι πληροφορίες που αντλούμε μέσα από αυτήν σχετίζονται με την Διαγνωστική Ιατρική, την Εγκληματολογία, την Φαρμακολογία, την Ανθρωπολογία (Human Genome Program), καθώς και την Γεωργία. Με την χρήση της τεχνολογίας αλληλούχισης προσφέρονται γρήγορες και ακριβείς απαντήσεις που αφορούν τις παραπάνω επιστήμες.

Παρ' όλα αυτά στην Ελλάδα η τεχνολογία αυτή δεν είναι ευρέως εφαρμόσιμη, και οι επιστήμονες καταφεύγουν στις παραδοσιακές τεχνικές διάγνωσης, είτε λόγω του κόστους των μηχανημάτων ή του κόστους εφαρμογής των τεχνικών, είτε λόγω μη επαρκούς εξειδίκευσης. Ελπίζω μέσα από αυτή την εργασία η Τεχνολογία Αλληλούχισης να γίνει ευρέως γνωστή και κατανοητή.

Η τεχνολογία αλληλούχισης έχει κάνει τεράστια πρόοδο τα τελευταία χρόνια. Από το πρώτο γονιδίωμα των 5386 βάσεων πλέον γίνεται αλληλούχιση ολόκληρου του ανθρώπινου γονιδιώματος. Είναι αξιοσημείωτο ότι τεχνολογία αυτή γεννήθηκε και εξελίχθηκε μέσα στα τελευταία 30 χρόνια, με τις τεχνικές αλληλούχισης νέας γενιάς να αποτελούν φαινόμενο των τελευταίων 5 ετών.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία έχει ως θέμα την Ιστορία της Τεχνολογίας Αλληλούχισης Βιομορίων ή αλλιώς “The History of Sequencing Technology” και πραγματοποιήθηκε κατά την διάρκεια προπτυχιακών σπουδών στο τμήμα Ιατρικών Εργαστηρίων στο Αλεξάνδρειο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Θεσσαλονίκης. Σκοπός αυτής της εργασίας είναι η παρουσίαση της ιστορικής αναδρομής της τεχνολογίας αλληλούχισης και η περιγραφή των επιμέρους μεθόδων αλληλούχισης.

Η πτυχιακή εργασία χωρίζεται σε δύο διακριτά μέρη. Στο πρώτο μέρος ξεδιπλώνεται η ιστορία της αλληλούχισης βιομορίων. Από τις πρώτες σκέψεις και ανάγκες της επιστημονικής κοινότητας του 1960 έως και τις σύγχρονες μεθόδους του σήμερα. Η ιστορική αναδρομή ακολουθεί τον ήδη υπάρχοντα διαχωρισμό που της έχει δοθεί σε τρεις βασικές περιόδους: την *Αλληλούχιση 1^{ης} Γενιάς* η οποία αναφέρεται στην πρώιμη περίοδο ανακαλύψεων και φτάνει έως και την Αλληλούχιση κατά Sanger που θεωρείται σταθμός για την ιστορία της. Συνεχίζει με την *Αλληλούχιση 2^{ης} Γενιάς* στην οποία αναφέρονται όλες οι εξελίξεις στις τεχνικές και ολοκληρώνεται με την *Αλληλούχιση 3^{ης} ή Νέας Γενιάς* στην οποία συγκαταλέγονται οι πιο εξελιγμένες τεχνικές καθώς και εκείνες που ακόμα είναι υπό έρευνα.

Στο δεύτερο μέρος της εργασίας αναλύονται βήμα προς βήμα όλες οι τεχνικές με την σειρά της εμφάνισής τους. Είναι χαρακτηριστικό πως μετά από ένα σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα οι πιο απλές αλλά επίπονες «δια χειρός» μέθοδοι αντικαθίστανται μερικώς από τις περισσότερο πολύπλοκες αλλά αυτοματοποιημένες μεθόδους 2^{ης} και 3^{ης} γενιάς αλληλούχισης. Οι τεχνικές γίνονται όλο ένα και πιο απλές στην εργαστηριακή πράξη, με δυνατότητα αλληλούχισης μεγαλύτερων και πολυπλοκότερων γονιδιωμάτων, με χαμηλότερο κόστος και εξοικονόμηση χρόνου, χρησιμοποιώντας όμως πιο σύνθετες και εξελιγμένες τεχνολογίες.

ABSTRACT

The current senior thesis is about the “History of Sequencing Technology” and is being made during the undergraduate studies of Biomedical Laboratory Sciences faculty in Technological Educational Institute of Thessaloniki. The main purpose of this thesis is the historical throwback of sequencing technology and the detailed description of every method that has ever happened.

This thesis consists of two parts. The first one fulfils every historical detail that explains the evolution of the sequencing technology. From the first scientists’ manuscripts at 1960 until the contemporary technics that are being used today. The history of sequencing is divided in three periods. The “*First Generation Sequencing*” which contains the primary period of sequencing technology until the breakthrough with Sanger’s Method. The next one is the “*Second Generation Sequencing*” containing all the evolution of sequencing technics and the last one is “*Third or Next Generation Sequencing*” which involves the most contemporary methods scientists use today and the ones that are still in progress of researching.

At the second part there is a detailed description of each and every technic that has ever been used in the order of their appearance. It is noteworthy that after a short period of time, the simply but strenuous manual methods are being replaced by the more complicated automated industrial systems of 2nd and 3rd generation sequencing. The sequencing techniques are becoming more and more simpler during the laboratory work, with the ability of sequencing more complex and bigger genomes than ever before, with lower cost and less hard laboring , by the use of the most complex and developed technologies.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. James M. Heather and Benjamin Chain, The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA, *Genomics*. 2016 Jan, 107(1): 1–8.
2. Pregledni Lanak , The History of DNA Sequencing, *J Med Biochem* ,2013 32: 301–312
3. Holley R.W., Apgar J., Merrill S.H., Zubkoff P.L. Nucleotide and oligonucleotide compositions of the alanine-, valine-, and tyrosine-acceptor soluble ribonucleic acids of yeast. *J. Am. Chem. Soc.* 1961;83:4861–4862.
4. Holley R.W. Structure of a ribonucleic acid. *Science*. 1965;147:1462–1465.
5. Sanger F., Brownlee G., Barrell B. A two-dimensional fractionation procedure for radioactive nucleotides. *J. Mol. Biol.* 1965;13:373IN4.
6. Min-Jou W., Haegeman G., Ysebaert M., Fiers W. Nucleotide sequence of the gene coding for the bacteriophage MS2 coat protein. *Nature*. 1972;237:8288. (URL <http://adsabs.harvard.edu/abs/1972Natur.237...82J>)
7. Wu R., Kaiser A. Structure and base sequence in the cohesive ends of bacteriophage lambda DNA. *J. Mol. Biol.* 1968;35:523–537.
8. Wu R. Nucleotide sequence analysis of DNA. *Nature*. 1972;51:501–521.
9. Sanger F., Donelson J.E., Coulson A.R., Kossel H., Fischer D. Use of DNA polymerase I primed by a synthetic oligonucleotide to determine a nucleotide sequence in phage f1 DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1973;70:1209–1213.
10. Padmanabhan R., Jay E., Wu R. Chemical synthesis of a primer and its use in the sequence analysis of the lysozyme gene of bacteriophage T4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1974;71:2510–2514.
11. Sanger F., Coulson A. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.* 1975;94:441–448.
12. Maxam A.M., Gilbert W. A new method for sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1977;74:560–564.
(URL <http://www.pnas.org/content/74/2/560.short>)
13. Sanger F. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature*. 1977;265:687–695.

14. Fred Sanger S., Nicklen A.R.C. DNA sequencing with chain-terminating. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1977;74:5463–5467.
15. Chidgeavadze Z., Beabealashvilli R.S. 2', 3'-Dideoxy 3'aminonucleoside 5'-triphosphates are the terminators of DNA synthesis catalyzed by DNA polymerases. *NucleicAcidsRes.* 1984;12:1671–1686.
16. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, et al. Sequenceandorganizationofthehumanmitochondrialgenome. *Nature* 1981; 290: 457–65.
17. Fleischmann RD, Adams MD, White O, Clayton RA, Kirkness EF, Kerlavage AR, et al. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilusinfluenzae* Rd. *Science* 1995; 269: 496–512.
18. Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, et al. Lifewith 6000 genes. *Science* 1996; 274: 546, 563–47.
19. TCEC. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: A platform for investigating biology. *Science* 1998; 282: 2012–8.
20. TAGI. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 2000; 408: 796–815.
21. Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD, Amanatides PG, et al. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 2000; 287: 2185–95.
22. Myers EW, Sutton GG, Delcher AL, Dew IM, Fasulo DP, Flanigan MJ, et al. A whole-genomeassemblyof*Drosophila*. *Science* 2000; 287: 2196–204.
23. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The sequence of the human genome. *Science* 2001; 291: 1304–51.
24. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409: 860–921.
25. IHGS. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 2004; 431: 931–45.
26. Levy S, Sutton G, Ng PC, Feuk L, Halpern AL, Walenz BP, et al. The diploid genome sequence of an individual human. *PLoSBIol* 2007; 5: e254
27. Drmanac R, Labat I, Brukner I, Crkvenjakov R. Sequencing of megabase plus DNA by hybridization: theory of the method. *Genomics* 1989; 4: 114–28

28. Drmanac R, Strezoska Z, Labat I, Drmanac S, Crkve - njakov R. Reliable hybridization of oligonucleotides as short as six nucleotides. *DNA Cell Biol* 1990; 9: 527–34.
29. Drmanac R, Drmanac S, Chui G, Diaz R, Hou A, Jin H, et al. Sequencing by hybridization (SBH): advantages, achievements, and opportunities. *AdvBiochemEngBiotechnol* 2002; 77: 75–101.
30. Hacia JG. Resequencing and mutational analysis using oligonucleotide microarrays. *NatGenet* 1999; 21: 42–7.
31. James M. Heather and Benjamin Chain, The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA, *Genomics*. 2016 Jan, 107(1): 3
32. PregledniLanak , The History of DNA Sequencing, *J Med Biochem* ,2013 32: 305
33. NyrénP.I. Enzymatic method for continuous monitoring of DNA polymerase activity. *Anal. Biochem.* 1987;238:235–238.
34. Ronaghi M., Karamohamed S., Pettersson B., Uhlen M., NyrénP.I. Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Anal. Biochem.* 1996;242:84–89.
35. Ronaghi M., Uhlen M., Nyrén P.1. A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science*. 1998;281:363–365.
(URL <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.281.5375.363>)
36. Voelkerding K.V., Dames S.a., Durtschi J.D. Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. *Clin. Chem.* 2009;55:641–658. (URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19246620>)
37. Illumina. HiSeq sequencing systems: Specification sheet. 2011.
38. PregledniLanak , The History of DNA Sequencing, *J Med Biochem* ,2013 32:308
39. James M. Heather and Benjamin Chain, The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA, *Genomics*. 2016 Jan, 107(1):4
40. Lilian T. C. Franc:a, Emanuel Carrilho and Tarso B. L. Kist3, A review of DNA sequencing techniques, *Quarterly Reviews of Biophysics*,2002, pp. 190
41. Braslavsky I., Hebert B., Kartalov E., Quake S.R. Sequence information can be obtained from single DNA molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003;100:3960–3964.

42. Harris T.D. Single-molecule DNA sequencing of a viral genome. *Science* (New York, N.Y.) 2008;320:106–109.
43. Schadt E.E., Turner S., Kasarskis A. A window into third-generation sequencing. *Hum. Mol. Genet.* 2010;19:R227–R240.
44. Pareek C.S., Smoczynski R., Tretyn A. Sequencing technologies and genome sequencing. *J. Appl. Genet.* 2011;52:413–435.
45. GenomeWeb . 2012. HelicosBioSciences Files for Chapter 11 Bankruptcy Protection.
46. Eid J, Fehr A, Gray J, Luong K, Lyle J, Otto G, et al. Realtime DNA sequencing from single polymerase molecules. *Science* 2009; 323: 133–8
47. PregledniLanak , The History of DNA Sequencing, *J Med Biochem* ,2013 32: 309
48. Clarke J, Wu HC, Jayasinghe L, Patel A, Reid S, Bayley H. Continuous base identification for single-molecule nanopore DNA sequencing. *Nat Nanotechnol* 2009; 4: 265–70.
49. Rothberg JM, Hinz W, Rearick TM, Schultz J, Mileski W, Davey M, et al. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature* 2011; 475: 348–52.
50. Clyde A. Hutchison, DNA sequencing: bench to bedside and beyond, *Nucleic Acids Res.* 2007 Sep; 35(18): 6227–6237
51. Dayhoff MO, Schwartz RM, Chen HR, Hunt LT, Barker WC, Orcutt BC. Nucleic acid sequence database. 1981;1 National Biomedical Research Foundation, Georgetown University Medical Center, Washington D.C. 20001.
52. Sanger F, Air GM, Barrell BG, Brown NL, Coulson AR, Fiddes CA, Hutchison CA, Slocombe PM, Smith M. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature.* 1977;265:687–695.
53. University of technology Malaysia, Sanger DNA Sequencing, 2014 URL: <http://ysk0220.wixsite.com/ysk0220/history>
54. PregledniLanak , The History of DNA Sequencing, *J Med Biochem* ,2013 32:302
55. Maxam–Gilbert sequencing, Wikipedia- free encyclopedia, 17 June 2018, URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Maxam%E2%80%93Gilbert_sequencing

56. OpenStax College, DNA structure and sequencing, Khan Academy, URL: <https://www.khanacademy.org/science/high-school-biology/hs-molecular-genetics/hs-biotechnology/a/dna-sequencing>
57. : Larry Li, Biologydictionary.net editors, DNA Sequencing, Biology Dictionary, January 25, 2018 , 3.
58. James M. Heather and Benjamin Chain, The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA, Genomics. 2016 Jan Figure 1
59. Hood LE, Hunkapiller MW, Smith LM. Automated DNA sequencing and analysis of the human genome. Genomics 1987; 1: 201–12.
60. Pregledni Lanak , The History of DNA Sequencing, J Med Biochem ,2013 32:304
61. Magazine Science. Automated DNA Sequencing. Nov 26, 2016 URL: <https://www.magazinescience.com/en/biology/automated-dna-sequencing/>
62. Sanger, F. et al. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. Nature 265, 687–695 (1977).
63. Swerdlow, H., Wu, S.L., Harke, H. & Dovichi, N.J. Capillary gel electrophoresis for DNA sequencing. Laser-induced fluorescence detection with the sheath flow cuvette. J. Chromatogr. 516, 61–67 (1990).
64. Hunkapiller, T., Kaiser, R.J., Koop, B.F. & Hood, L. Large-scale and automated DNA sequence determination. Science 254, 59–67 (1991).
65. Lilian T. C. Franc: a, Emanuel Carrilho and Tarso B. L. Kist3, A review of DNA sequencing techniques, Quarterly Reviews of Biophysics, 2002, pp 181
66. Volker Pfeufer and Matthias Schulze. GENETICS/DNA SEQUENCING: Laser fluorescence powers sequencing advances. Bioptics World. 21 January 2015
67. Ewing, B. & Green, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. Genome Res. 8, 186–194 (1998).
68. Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M.C. & Green, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. Genome Res. 8, 175–185 (1998).
69. Jay Shendure & Hanlee Ji. Next-generation DNA sequencing. Nature Biotechnology. October 2008, number 10.

70. Lander E.S. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001;409:860–921. (URL <http://www.nature.com/nature/journal/v409/n6822/abs/409860a0.html>)
71. Venter J.C. The sequence of the human genome. *Science*. 2001;291:1304–1351. (URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11181995>)
72. Jay Shendure & Hanlee Ji. Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology*. October 2008,number 10, pp:1136
73. Radoje Drmanac · Snezana Drmanac · Gloria Chui · Robert Diaz · Aaron Hou · Hui Jin · Paul Jin · Sunhee Kwon · Scott Lacy · Bill Moeur · Jay Shafro · Don Swanson · Tatjana Ukrainczyk · Chongjun Xu · Deane Little, Sequencing by Hybridization (SBH):Advantages,Achievements,and Opportunities, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* , February 2002,77:75-101
74. Strezoska Z, Paunesku T, Radosavljevic D, Labat I, Drmanac R, Crkvenjakov R. DNA sequencing by hybridization: 100 bases read by a non-gel-based method. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 10089–93.
75. Drmanac R, Drmanac S, Strezoska Z, Paunesku T, Labat I, Zeremski M, et al. DNA sequence determination by hybridization: a strategy for efficient large-scale sequencing. *Science* 1993; 260: 1649–52.
76. Pregledni Lanak , The History of DNA Sequencing, *J Med Biochem* ,2013 32: 303, figure 1
77. Nyrén P.I., Lundin A. Enzymatic method for continuous monitoring of inorganic pyrophosphate synthesis. *Anal. Biochem*. 1985;509:504–509. (URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269785902118>)
78. Lilian T. C. Franc: a, Emanuel Carrilho and Tarso B. L. Kist3, A review of DNA sequencing techniques, *Quarterly Reviews of Biophysics*,2002, pp 188
79. Wikipedia, the free encyclopedia. Pyrosequencing, 24 July 2018
80. Ronaghi, M. Karamohamed, S. Petterson, B. Uhlen, M.and Nyren, P. (1996). Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Analyt. Biochem*. 242, 84–89.

81. Ronaghi, M. (2001). Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Res.* 11, 3–11.
82. Ronaghi M., B. Uhlen M. & Nyren P. (1998a). A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science* 281, 363–365.
83. Ronaghi, M., Nygren, M., Lunderberg, J. & Nyren, P. (1999). Analyses of secondary structures in DNA by pyrosequencing. *Analyt. Biochem.* 267, 65–71.
84. Norbert Niklas*, Johannes Pröll, Martin Danzer, Stephanie Stabentheiner, Katja Hofer and Christian Gabriele. Access Routine performance and errors of 454 HLA exon sequencing in diagnostics . *BMC Bioinformatics*, 2013, 14:17
URL:https://www.researchgate.net/publication/237016077_Routine_performance_and_errors_of_454_HLA_exon_sequencing_in_diagnostics
85. Ronaghi, M. (2000). Improved performance of pyrosequencing using single-stranded DNA-binding protein. *Analyt. Biochem.* 286, 282–288.
86. Shendure, J. et al. Accurate multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome. *Science* 309, 1728–1732 (2005).
87. Ng, P. et al. Gene identification signature (GIS) analysis for transcriptome characterization and genome annotation. *Nat. Methods* 2, 105–111 (2005).
88. Tawfik D.S., Griffiths A.D. Man-made cell-like compartments for molecular evolution. *Nat. Biotechnol.* 1998;16:652–656. (URL http://www.weizmann.ac.il/Biological_Chemistry/scientist/Tawfik/papers/)
89. Jay Shendure¹ & Hanlee Ji². Next-generation DNA sequencing, *Nature Biotechnology*, volume 26, number 10 ,October 2008,
90. Jay Shendure¹ & Hanlee Ji². Next-generation DNA sequencing, *Nature Biotechnology*, volume 26, number 10 ,October 2008, 1137-1138
91. Nalini A.L. Mehta & David J. Dow, and GlaxoSmithKline and Anthony M. Battram. DNA sequencing technologies and emerging applications in drug discovery, 13 December 2011
92. Pregledni Lanak , The History of DNA Sequencing, *J Med Biochem* ,2013 32:307
93. Turcatti, G., Romieu, A., Fedurco, M. & Tairi, A.P. A new class of cleavable fluorescent nucleotides: synthesis and optimization as reversible

- terminators for DNA sequencing by synthesis. *Nucleic Acids Res.* 36, e25 (2008).
94. Faster Sequencing and Data Processing Times. Illumina 2015
 95. What is mate pair sequencing for? ECSEQ Bioinformatics. March 20, 2017
 96. What is mate pair sequencing for? ECSEQ Bioinformatics. March 20, 2017
Figure 1 URL: <https://www.ecseq.com/support/ngs/what-is-mate-pair-sequencing-useful-for>
 97. Shendure, J. et al. Accurate multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome. *Science* 309, 1728–1732 (2005).
 98. McKernan, K., Blanchard, A., Kotler, L. & Costa, G. Reagents, methods, and libraries for bead-based sequencing. US patent application 20080003571 (2006).
 99. Pregledni Lanak , The History of DNA Sequencing, *J Med Biochem* ,2013 32:309
 100. Dressman, D., Yan, H., Traverso, G., Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 8817–8822 (2003).
 101. From Structure-Function Analyses to Protein Engineering for Practical Applications of DNA Ligase. Maiko Tanabe, Yoshizumi Ishino, and Hirokazu Nishida. Hindawi Publishing Corporation *Archaea*, 2015,20
 102. Tech Summary: ABI's SOLiD (Seq. by Oligo Ligation/Detection). SEQanswers, November 2007.
 103. Jett, J. H., Keller, R. A., Martin, J. C., Marrone, B. L., Mouzis, R. K., Rayliff, R. L., Seitzinger, N. K., Shera, E. B. & Stewart, C. C. (1989). Highspeed DNA sequencing – an approach based upon fluorescence detection of single molecules. *J. biomolec. struct. Dyn.* 7, 301–309.
 104. Shera, E. B., Sheitzinger, N. K., Davis, L. M., Keller, R. A. & Soper, S. A. (1990). Detection of single fluorescent molecules. *Chem. Phys. Lett.* 174, 553–557.
 105. Harding, J. D. & Keller, R. A. (1992). Single molecule detection as an approach to rapid DNA sequencing. *Trends Biotechnol.* 10, 55–57.

106. Dorre K., Brakman, S., Brinkmeier, M., Han, K. T., Riebeself, K., Schwille, P., Stephan, J., Wetzel, T., Lapezyna, M., Stuke, M., Bader, R., Hinz, M., Selinger, H., Holm, J., Eigen, M. & Ringler, R. (1997). Techniques for single molecule sequencing. *Bioimaging* 5, 139–152.
107. Techniques for single molecule sequencing. Klaus D'orre, Susanne Brakmann, Michael Brinkmeier, Kyung-Tae Han, Katja Riebeseel, Petra Schwille, Jens Stephan, Timm Wetzel, Markus Lapczyna, Michael Stuke, Raoul Bader, Michael Hinz, Hartmut Seliger, Johan Holmk, Manfred Eigen and Rudolf Rigler. *Bioimaging* 5, 1997. 139–152.
108. Stephan, J., Dorre K., Brakmann, S., Winkler, T., Wetzel, T., Lapezyna, M., Stuke, M., Angerer, B., Ankenbauer, W., Foldes-Papp, Z., Ringler, R. & Eigen, M. (2001). Towards a general procedure for sequencing single DNA molecules. *J. Biotechnol.* 86, 255–267.
109. Davis, L. M., Fairfield, F. R., Harger, C. A., Jett, J. H., Keller, R. A., Hahn, J. H., Krakowski, L. A., Marrone, B. L., Martin, J. C., Nutter, H. L., Ratliff, R. L., Shera, E. B., Simpson, D. J. & Soper, S. A. (1991). Rapid DNA sequencing based upon single molecule detection. *Genetic Analysis – Biomolec. Engng* 8, 1–7.
110. Goodwin, P. M., Cai, H., Jett, J. H., Ishaug-Riley, S. L., Machara, N. P., Semin, D. J., Orden, A. V. & Keller, R. A. (1997). Application of single molecule detection to DNA sequencing. *Nucleos. Nucleot.* 16, 543–550.
111. Greenless, G. W., Clark, D. L., Kaufman, S. L., Lewis, D. A., Tonn, J. F. & Broadhurst, J. H. (1977). High-resolution laser spectroscopy with minute samples. *Opt. Commun.* 23, 236–239.
112. Wilkerson, C. W., Goodwin, P. M., Ambrose, W. P., Martin, J. C. & Keller, R. A. (1993). Detection and lifetime measurement of single molecules in flowing sample streams by laser-induced fluorescence. *Appl. Phys. Lett.* 62, 2030–2032.
113. Kneipp, K., Kneipp, H., Kartha, V. B., Manoharan, R., Deinum, G., Itzakan, I., Dasari, R. R. & Feld, M. S. (1998). Detection and identification of a single DNA base molecule using surface-enhanced Raman scattering (SERS). *Phys. Rev.(E)* 57, R6281–R6284.

114. Eigen, M. & Ringler, R. (1994). Sorting single molecules: application to diagnostics and evolutionary biotechnology. *Proc. natn. Acad. Sci. USA* 91, 5740–5747.
115. Van Orden, A., Machara, N. P., Goodwin, P. M. & Keller, R. A. (1998). Single-molecule identification in flowing sample streams by fluorescence burst size and intraburst fluorescence decay rate. *Analyt. Chem.* 70, 1444–1451.
116. Lilian T. C. Franc:ca, Emanuel Carrilho and Tarso B. L. Kist3, A review of DNA sequencing techniques, *Quarterly Reviews of Biophysics*, 2002, pp 191
FIGURE 9
117. Levene M.J. Zero-mode waveguides for single-molecule analysis at high concentrations. *Science.* 2003;299:682–686. (URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12560545>)
118. Zero-mode Waveguide & Single Molecule Real Time Sequencing. *Petri Dish Talk*. October 2011.
119. Metzker ML. Sequencing technologies – the next generation. *Nat Rev Genet* 2010; 11: 31–46.
120. Anthony Rhoads. *PacBio Sequencing and Its Applications*. 2015
URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1672022915001345#f0015>
121. Drmanac R, Sparks AB, Callow MJ, Halpern AL, Burns NL, Kermani BG, et al. Human genome sequencing using unchained base reads on self-assembling DNA nanoarrays. *Science* 2010; 327: 78–81.
122. D. Mohankumar. *Nanoball Sequencing*. *Biotechnology* 2011
123. DNA nanoball sequencing. *Wikipedia*, 2017 Figure 3
124. DNA nanoball sequencing. *Wikipedia*, 2017 Figure 4
125. DNA nanoball sequencing. *Wikipedia*, 2017 Figure 6
126. Ion Torrent Next-Generation Sequencing Technology. *Thermo Fisher Scientific*. (URL: <https://www.thermofisher.com/gr/en/home/life-science/sequencing/next-generation-sequencing/ion-torrent-next-generation-sequencing-technology.html>)
127. Mehdi Kchouk, Jean-François Gibrat and Mourad Elloumi. *Generations of Sequencing Technologies: From First to Next Generation*. *Biology and Medicine*, March 2017 Figure 3

128. Ion Torrent Next-Generation Sequencing Technology. Thermo Fisher Scientific.(URL:<https://www.thermofisher.com/gr/en/home/life-science/sequencing/next-generation-sequencing/ion-torrent-next-generation-sequencing-technology.html>)
129. Deamer D.W., Akeson M. Nanopores and nucleic acids: prospects for ultrarapid sequencing. *Trends Biotechnol.* 2000;18:147–151.
130. Church G, Deamer DW, Branton D, Baldarelli R, Kasianowicz J. Measuring physical properties. US5795782; 1998.
131. Yanxiao Feng, Yuechuan Zhang, Cuifeng Ying, Deqiang Wang, and Chunlei. Nanopore-based Fourth-generation DNA Sequencing Technology. *Genomics Proteomics Bioinformatics* .2015 Feb 13(1):4–16. URL:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4411503/>
132. Clarke J., Wu H.C., Jayasinghe L., Patel A., Reid S., Bayley H. Continuous base identification for single-molecule nanopore DNA sequencing. *Nat Nanotechnol.* 2009;4:265–270.
133. Derrington I.M., Butler T.Z., Collins M.D., Manrao E., Pavlenok M., Niederweis M. Nanopore DNA sequencing with MspA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:16060–16065.
134. Yanxiao Feng, Yuechuan Zhang, Cuifeng Ying, Deqiang Wang, and Chunlei. Nanopore-based Fourth-generation DNA Sequencing Technology. *Genomics Proteomics Bioinformatics* .2015 Feb 13(1):4–16.
135. Song L.Z., Hobaugh M.R., Shustak C., Cheley S., Bayley H., Gouaux J.E. Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science.* 1996;274:1859–1866.
136. Branton D., Deamer D.W., Marziali A., Bayley H., Benner S.A., Butler T. The potential and challenges of nanopore sequencing. *Nat Biotechnol.* 2008;26:1146–1153.
137. Wendell D., Jing P., Geng J., Subramaniam V., Lee T.J., Montemagno C. Translocation of double-stranded DNA through membrane-adapted phi29 motor protein nanopores. *Nat Nanotechnol.* 2009;4:765–772.
138. Venkatesan B.M., Dorvel B., Yemenicioglu S., Watkins N., Petrov I., Bashir R. Highly sensitive, mechanically stable nanopore sensors for DNA analysis. *Adv Mater.* 2009;21:2771

139. Protein nanopore-based DNA sequencing. Ghadiry Laboratory. The Scripps Research Institute, 2017
140. Liu S., Zhao Q., Xu J., Yan K., Peng H.L., Yang F.H. Fast and controllable fabrication of suspended graphene nanopore devices. *Nanotechnology*. 2012;23:6.
141. Zhang X.G., Krstic P.S., Zikic R., Wells J.C., Fuentes-Cabrera M. First-principles transversal DNA conductance deconstructed. *Biophys J*. 2006;91:L04–L06.
142. Eisenstein M. Oxford Nanopore announcement sets sequencing sector abuzz. *Nat Biotechnol*. 2012;30:295–296.
143. Alberto Magi, Roberto Semeraro, Alessandra Mingrino, Betti Giusti, and Romina D'Aurizio. Nanopore sequencing data analysis: state of the art, applications and challenges. *Briefings in Bioinformatics*, 2017, 1–17
144. Magi A, Giusti B, Tattini L. Characterization of MinION nanopore data for resequencing analyses. *Brief Bioinform* 2016, doi: 10.1093/bib/bbw077
145. Hayden E.C. Data from pocket-sized genome sequencer unveiled. *Nature*. 2014
146. Mikheyev A.S., Tin M.M.Y. A first look at the Oxford Nanopore MinION sequencer. *Mol Ecol Resour*. 2014;14:1097–1102.
147. Eisenstein M. Oxford Nanopore announcement sets sequencing sector abuzz. *Nat Biotechnol*. 2012;30:295–296.