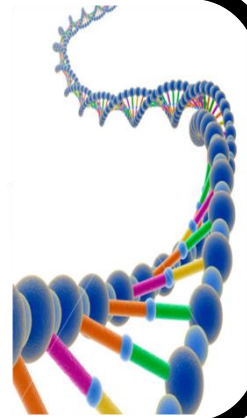
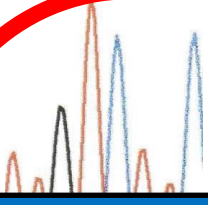


# Yeni nesil sekanslama

Next generation sequencing



# GİRİŞ...



DNA dizilerinin bilinmesi temel biyoloji ,biyoteknoloji,adli bilim tıbbi tanı koyma gibi pek çok sahada vazgeçilmez hâle gelmiştir.

DNA dizilemesi biyolojik araştırma ve keşifleri çok hızlandırmıştır. Modern DNA dizileme teknolojilerin mümkün kıldığı hızlı DNA dizileme sayesinde insan genom projesi'nde insan genomu dizilenebilmiştir. Benzer projelerle pekçok hayvan, bitki ve mikrop genomunun tam dizisi üretilebilmiştir.

İlk DNA dizileri 1970'lerin başlarında üniversite araştırmacıları tarafından iki-boyutlu kromatografiye dayanan zahmetli yöntemlerle elde edilmiştir. Otomatik analizle çalışan boya-tabanlı dizileme yöntemlerinin gelişimiyleDNA dizilemesi çok daha kolaylaşmış ve birkaç büyüklük mertebesi hızlanmıştır



# TARİH

1965

yılında Robert HOLLEY tarafından 74 nükleotidlik birtRNA molekülünün dizi analizi yapılmıştır.



1977

yılında Allan MAXAM-Walter GİLBERT ve Frederick SANGER tarafından iki farklı DNA dizi analizi yöntemi bulunmuştur.



1982

yılında Akiyoshi WADA DNA dizi analizinin otomatik olarak yapılmasını önermiştir ve robotlar geliştirilmeye başlanmıştır.



1986

yılında California Teknoloji Enstitüsünden (Caltech) Leroy HOOD ve Llyod SMİTH tarafından DNA dizi analizinde kullanılacak tam otomatik bir makine bulunmuştur.



# TARİH

1990

yılında Edward UBERBACHER tarafından bir gen bulma programı olan GRAİL kullanılmaya başlanmıştır.



1992

yılında 21 kromozomun DNA Dizi Analizi tamamlanmıştır.



1995

yılında Craig VENTER, Claire FRASER ve Hamilton SMİTH tarafından *Haemophilus influenzae'* ya ait ilk DNA dizisi yayınlanmıştır.



1996

yılında ulusal bir konsorsiyum tarafından bir ekmek mayası olan *S.cerevisiae'nin* DNA dizisi yayınlanmıştır.



1998

yılında Sanger Center ve Washington Üniversitesi bilim adamları tarafından *Caenorhabditis elegans'* in DNA dizisi açıklanmıştır.



# TARİH

1999

*yılında İngiltere, Japonya ve ABD'den bilim adamları tarafından insanın 22. kromozomunun DNA dizisi tamamlanmıştır*



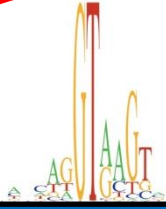
2000

*yılında Celera ve işbirliği içinde olduğu üniversiteler tarafından *Drosophila melanogaster*' in DNA dizisi açıklanmıştır. 2000 yılı Haziran ayı içinde İnsan Genom Projesi katılımcıları ve Celera' nın insan gen haritası taslağını tamamladığı açıklanmıştır. *Arabidopsis thaliana* 2000 yılında DNA dizisi açıklanan ilk bitki olmuştur.*



2003

*yılında Whitehead Enstitüsünde görevli David PAGE ve arkadaşları Y kromozomunun dizi analizini tamamlamışlardır.*



# SANGER METHODU



*Prosedür PCR nin işleyişine benzer DNA tek zincir haline getirilir.Reaksiyona girecek olan karışımda bol miktarda dört çeşit normal nükleotid dATP ; dGTP ; dCTP ; dTTP bulunur*

*Karışımda aynı zamanda diziyi rastgele sonlandırmak için farklı renkte flouresan kimyasallarla işaretlenmiş dideoxynükleotidler vardır. ddATP; ddGTP ; ddCTP ; ddTTP ; DNA polymerase I ise sentezde zincirin uzaması aşamasında gereklidir.*



# SANGER METHODU

*Zincir uzaması esnasında normal nükleotidler sırayla eklenir; fakat DNA polimeraz normal deoxynükleotid yerine dideoxy nükleotid (renkli olarak gösterilen) eklediği zaman zincirin uzaması sonlanır.*

*Bu eklenme rastgele olduğu için değişik uzunluklarda milyonlarca fragment oluşur. Bu fragmentler aynı zamanda sonlandıkları noktada kendilerine özgü flouresan boya da taşımaktadırlar.*

*Reaksiyon sonrasında elektrokinetik enjeksiyon sistemiyle çalışan cihazlarda fragmentler, kısdan uzuna doğru ayrılırlar. Bu ayırım kapiller denilen ince borucukların içerisinde o kadar hassas yapılı ki, birer nukleotid uzunluk farkıyla birbirlerini izlerler.*



# SANGER METHODU

*Sonlandırıldıkları noktada dideoxynükleotid taşıdıkları için her bir fragment dört çeşit dideoxynükleotidten birine ait flouresan boyada bulundurmaktadır.*

*Kapillerde bulunan küçük cam pencerenin önünden geçerken cihazın lazer sistemi flouresan boya uyararak her birinin kendine özgü dalga boyunda ışımaya yapmasını sağlar.*

*Yine cihaza entegre bir kamera sistemiyle bu ışımalar kaydedilir, sıraya konup değişik bilgisayar değerlendirmeleri ve filtrasyon işlemlerinden geçirildikten sonra DNA dizi bilgisi (sequence) olarak bize ulaşır.*





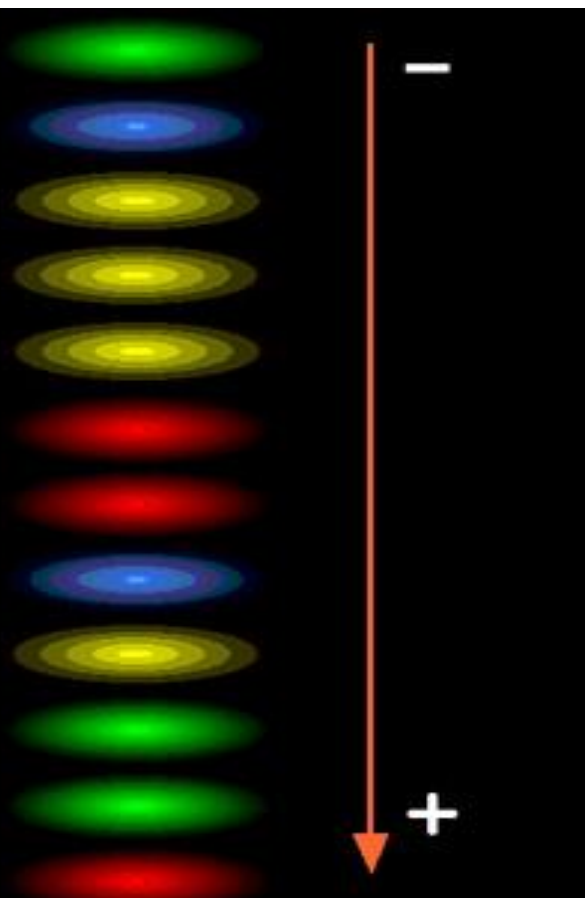


# SANGER METHODU



TAAGCTTGGGCA  
TAAGCTTGGGC  
TAAGCTTGGG  
TAAGCTTGG  
TAAGCTTG  
TAAGCTT  
TAAGCT  
TAAGC  
TAAG  
TAA  
TA  
T

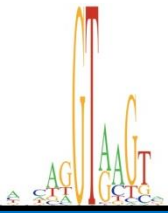
Séquençage d'ADN



-

+

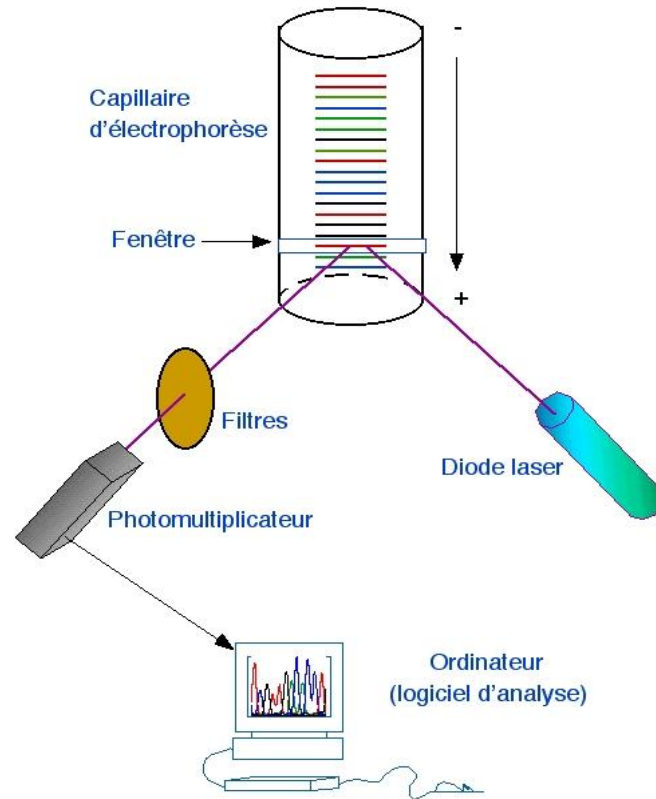
ATCG

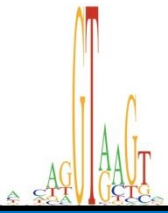


# SANGER METHODU

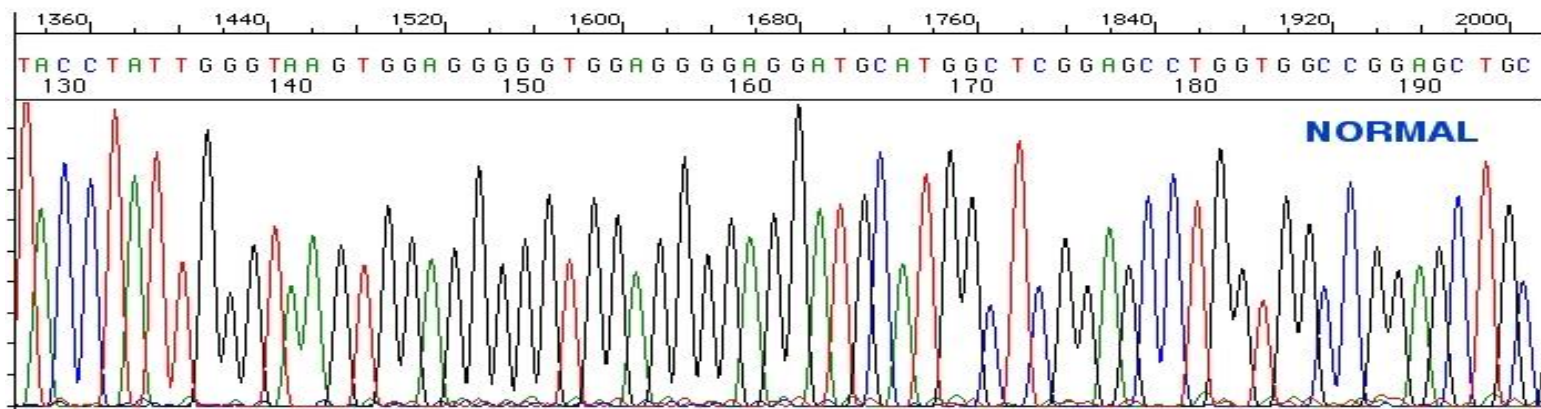
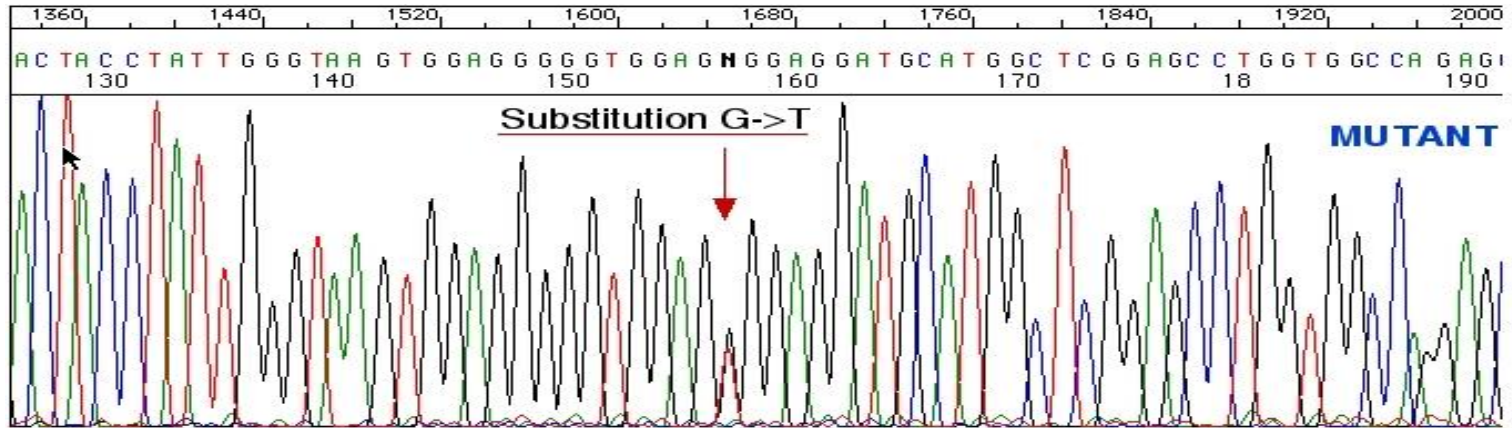
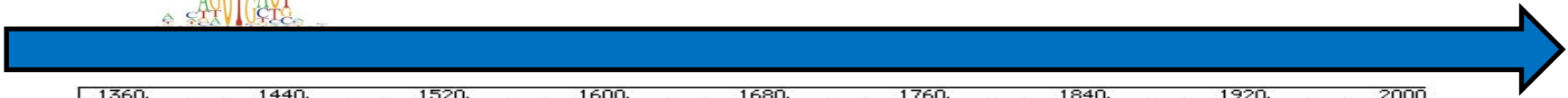


SÉQUENÇAGE AUTOMATIQUE  
Exemple de l'ABI PRISM 310

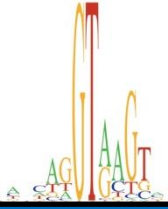




# SANGER METHODU



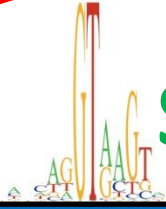
ATCG



# SANGER METHODU



Automated sanger en gelişmiş sanger makinesi



# SANGER METHODU dezavantajları



*DNA bazı parçaları sekense edemez sentromer gibi*

*Çok yavaş çalışıyor*

*Allel frekansı edemez*

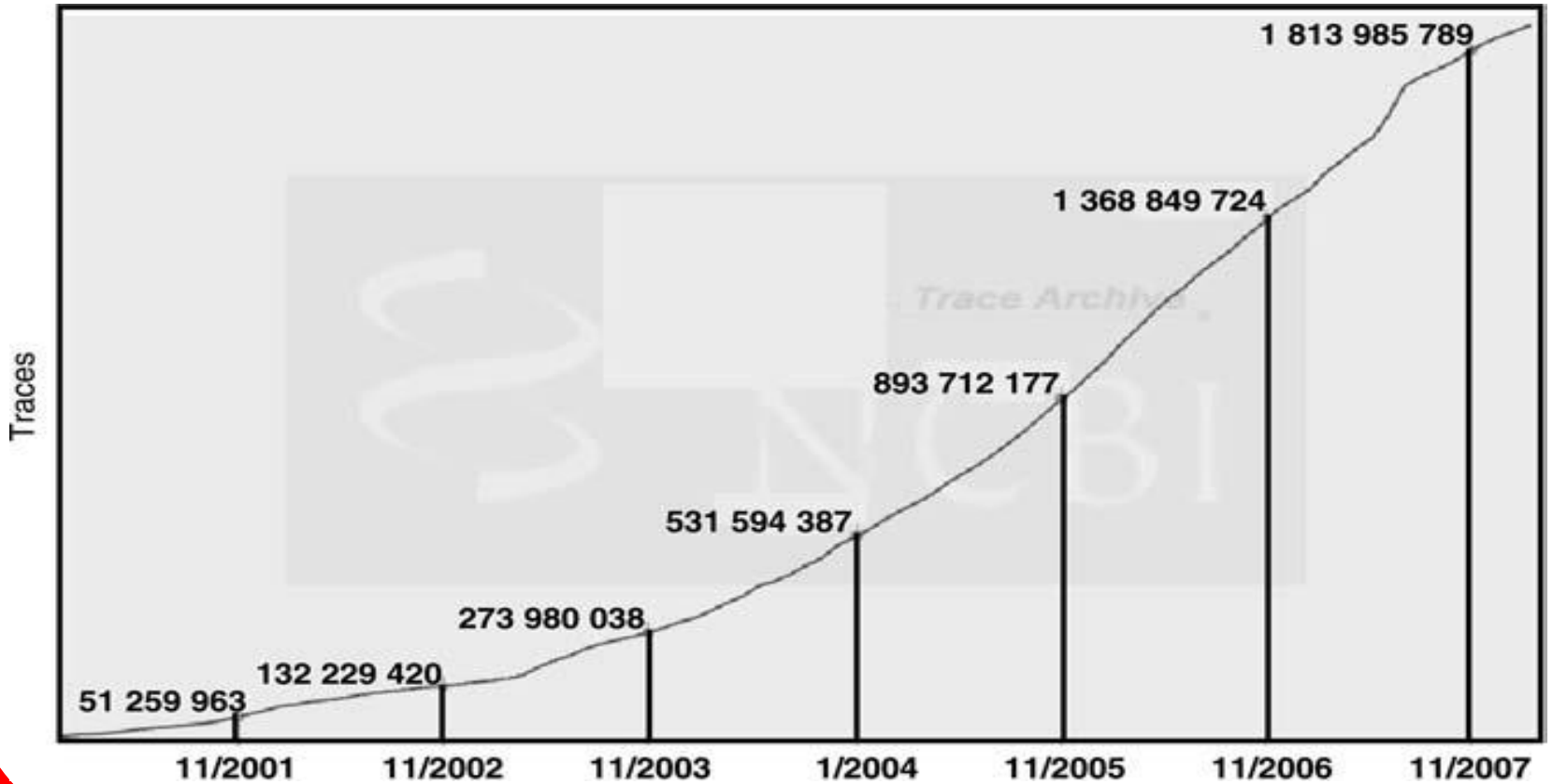
*Fiyatı çok pahalı 10.000.000 \$ = 1gb*



**Sanger metodunun yetmez**



# Sıralama oranı 30 kat artmıştır





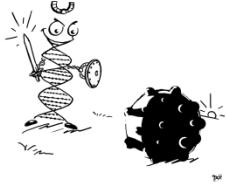
# GELECEK NESİL SEKANSLAMA

*Düşük masraflı dizilemeye olan büyük talep, yüksek hacimli dizileme teknolojilerinin geliştirilmesine yol açmıştır.*

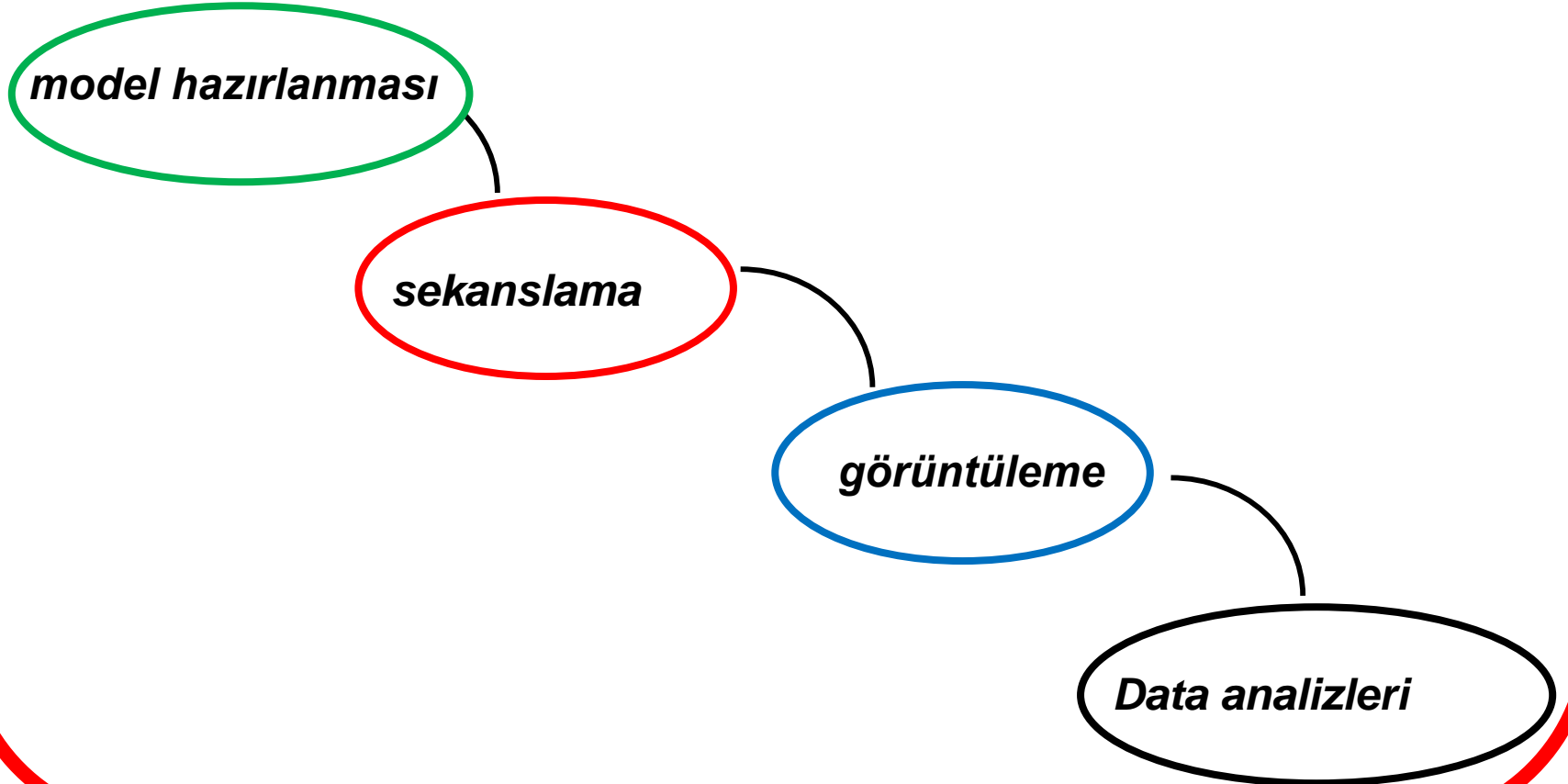
*Bu teknolojilerde dizileme süreci paralelleştirilerek binlerce veya milyonlarca dizi aynı anda üretilir. Yüksek hacimli dizileme teknolojilerinin amacı, standart boya sonlandırma yöntemleri ile mümkün olan DNA dizileme masrafını azaltmaktır*

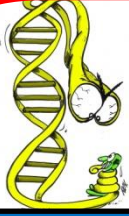






# GELECEK NESİL SEKANSLAMANIN PRENSİBİ





# SOLiD SİSTEM ROCHE/454

Pirodizilemenin paralelleştirilmiş bir versiyonu 454 life sciences tarafından geliştirilmiştir. Bu yöntemde bir yağ solüsyonu içindeki su damlacıklarında yer alan DNA, PCR ile çoğaltılır (emülsiyon PCR'si).

Tek bir DNA kalıbının tek bir primer kaplı boncuğa bağlı olduğu her damlacık, sonra klonal bir koloni oluşturur. Dizileme makinası çok sayıda pikolitre hacimli kuyulara sahiptir, bunların her biri tek bir boncuk ve dizileme enzimleri içerir.

Pirodizilemede lüsiferaz enzimi kullanılır, bu enzimin ürettiği ışık ile büyümekte olan DNA'ya eklenen her bir nükleotitin tespit edilir. Veriler birleştirilerek dizi okumaları üretilir.

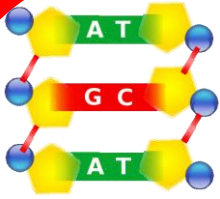
Bu teknoloji orta uzunlukta diziler üretir, baz başına maliyeti Sanger dizilemesi ile SOLiD arasında yer alır.



# SOLID SISTEM ROCHE/454





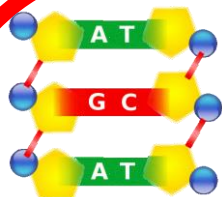


# SOLID-PHASE AMPLIFICATION ILLUMINA/SOLEXA

*Solexa (artık illumina bünyesinde) tersinir boya sonlandırıcılarına dayanan dizileme teknolojisini geliştirmiştir. DNA molekülleri bir lam üzerindeki primerlere bağlanır, sonra çoğaltılarak lokal, klonal koloniler oluştururlar (köprü amplifikasyonu).*

*Dört tip dNTP eklenir, dahil edilmeyen nükleotitler yıkanıp atılır. Pirodizilemeden farklı olarak, DNA ancak bir defada bir nükleotit kadar uzatılabilir. Bir kamera ile floresan işaretli nükleotitlerin resmi çekilir.*

*Sonra 3' uçtaki bloker ve floresan boya beraberce kimyasal olarak çıkarılır ve bir sonraki döngü başlar*



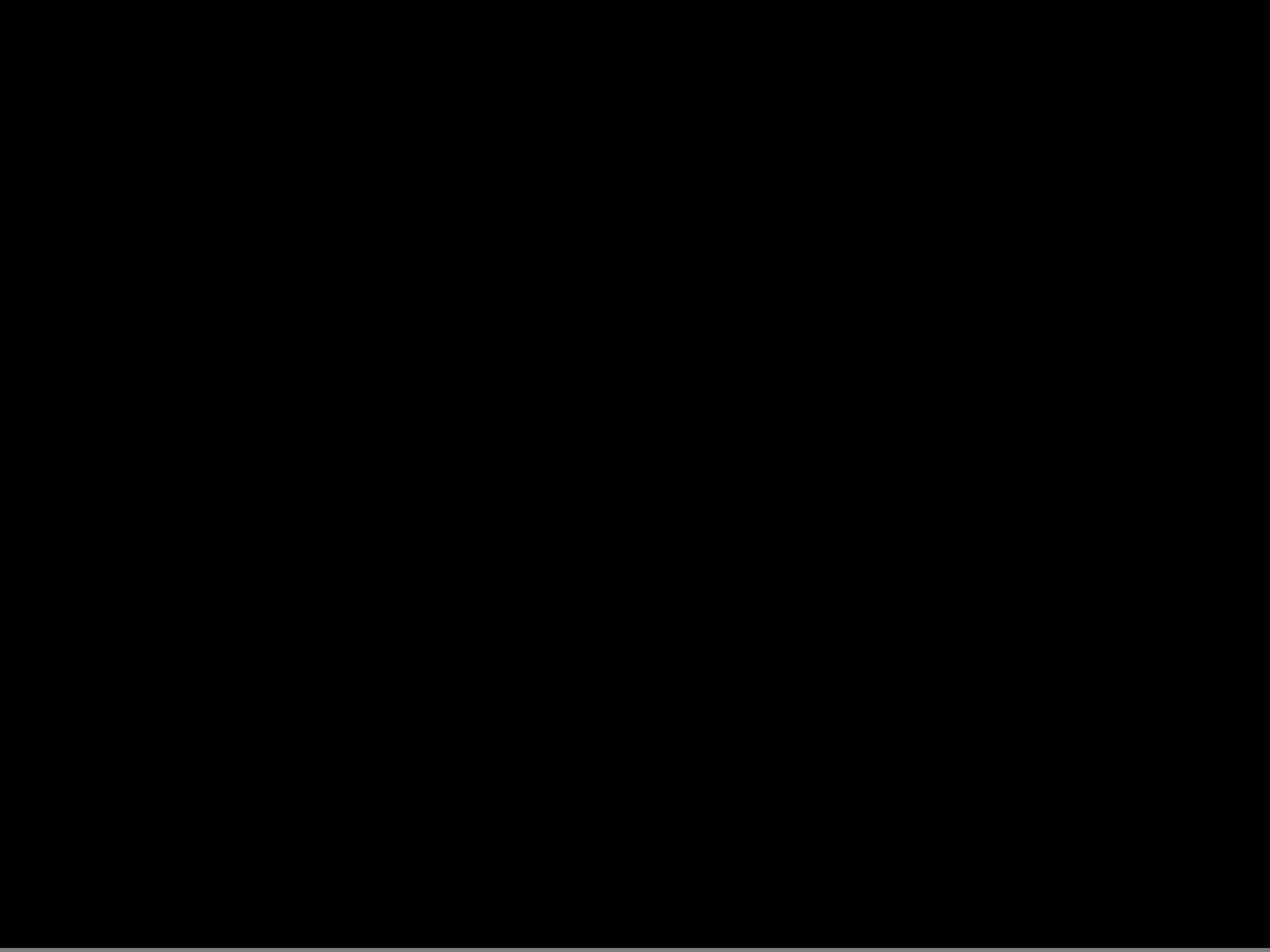
# SOLID-PHASE AMPLIFICATION ILLUMINA/SOLEXA





Platform	Library/ template preparation	NGS chemistry	Read length (bases)	Run time (days)	Gb per run	Machine cost (US\$)	Pros	Cons	Biological applications	Refs
Roche/454's GS FLX Titanium	Frag. MP/ emPCR	PS	330*	0.35	0.45	500,000	Longer reads improve mapping in repetitive regions; fast run times	High reagent cost; high error rates in homo- polymer repeats	Bacterial and insect genome <i>de novo</i> assemblies; medium scale (<3 Mb) exome capture; 16S in metagenomics	D. Muzny, pers. comm.
Illumina/ Solexa's GA <sub>II</sub>	Frag. MP/ solid-phase	RTs	75 or 100	4 <sup>†</sup> , 9 <sup>§</sup>	18 <sup>†</sup> , 35 <sup>§</sup>	540,000	Currently the most widely used platform in the field	Low multiplexing capability of samples	Variant discovery by whole-genome resequencing or whole-exome capture; gene discovery in metagenomics	D. Muzny, pers. comm.
Life/APG's SOLiD 3	Frag. MP/ emPCR	Cleavable probe SBL	50	7 <sup>†</sup> , 14 <sup>§</sup>	30 <sup>†</sup> , 50 <sup>§</sup>	595,000	Two-base encoding provides inherent error correction	Long run times	Variant discovery by whole-genome resequencing or whole-exome capture; gene discovery in metagenomics	D. Muzny, pers. comm.
Polonator G.007	MP only/ emPCR	Non- cleavable probe SBL	26	5 <sup>§</sup>	12 <sup>§</sup>	170,000	Least expensive platform; open source to adapt alternative NGS chemistries	Users are required to maintain and quality control reagents; shortest NGS read lengths	Bacterial genome resequencing for variant discovery	J. Edwards, pers. comm.
Helicos BioSciences HeliScope	Frag. MP/ single molecule	RTs	32*	8 <sup>†</sup>	37 <sup>†</sup>	999,000	Non-bias representation of templates for genome and seq-based applications	High error rates compared with other reversible terminator chemistries	Seq-based methods	91
Pacific Biosciences (target release: 2010)	Frag only/ single molecule	Real-time	964*	N/A	N/A	N/A	Has the greatest potential for reads exceeding 1 kb	Highest error rates compared with other NGS chemistries	Full-length transcriptome sequencing; complements other resequencing efforts in discovering large structural variants and haplotype blocks	S. Turner, pers. comm.





## **KAYNAKLARI**

**Sequencing technologies —the next generation SCIENCES**  
**Next-Generation Genome Sequencing Edited by Michal Janitz**

<http://portal.ncibi.org>

[www.appliedbiosystems.com/](http://www.appliedbiosystems.com/)

[www.roche-applied-science.com/](http://www.roche-applied-science.com/)





***teşekkür ederim ...***

