

## Third Generation DNA Sequencing Technologies

Ekrem Bolukbasi (Corresponding author)

Ankara University

Faculty of Science, Department of Biology, 06100 Turkey

E-mail: bolukbasi@ankara.edu.tr

Emine Sumer Aras

Ankara University

Faculty of Science, Department of Biology, 06100 Turkey

### Abstract

The first and second generation DNA sequencing (SGS) technologies revolutionized the field of genomics has led to developments beyond surprisingly large number of scientific studies. It has been effective on the understanding of whole living genome sequence, characterization of genomic DNA and DNA sequence variation and live genom sequence encodes information of which part of genom sides, additionally detection of methylated regions of the genome, determining the level of mRNA transcription and translation, fully understanding of the interactions between protein and DNA characterized by different isoforms of determined existing genes. However a new generation of DNA sequencing technologies has provided new opportunities to the current sequencing technologies by creating innovative and fertile ground for the study of genome sequencing. In parallel with the current second generation sequencing (SGS) technologies, in addition to the development of technology, the new generation of single molecule sequencing which is also the third-generation DNA sequencing (TGS) technologies have been rapidly developed. Some approaches which are developed on third generation DNA sequencing technologies shows that an advanced level of using technology and products provide to a rich and original information for researchers that cannot be obtained by experimental method on DNA sequencing. Third generation DNA sequencing technologies are shown to be capable of working with a lot of studies on whole genome of any organism, in less than a day, much less cost, complete, accurate and creating longer sequencing reads chains.

**Keywords:** DNA sequencing, Second generation DNA sequencing, Third generation DNA sequencing

## Üçüncü Nesil DNA Dizileme Teknolojileri

### Özet

Birinci ve ikinci nesil DNA dizileme (SGS) teknolojileri, genomik alanında devrim yaratmış ve çok sayıda bilimsel çalışmalarda şaşırtıcı gelişmelere yol açmıştır. Tüm canlı genom dizisinin anlaşılması, genomik DNA ve DNA dizi varyasyonlarının karakterize edilmesi ve canlı genom dizisinin hangi bölgesinin, hangi bilgileri kodladığı, taşıdığı, dahası genomun metilatlı bölgelerinin tespitinde, mRNA'nın transkripsiyon ve translasyon seviyesinin belirlenmesinde, protein ve DNA'nın aralarındaki etkileşimlerin tam anlaşılmasında, belirli mevcut genlerin farklı izoformlarının karakterize edilmesinde etkin olmuştur. Bununla birlikte yeni nesil DNA dizileme teknolojileri, mevcut dizileme teknolojilerine yenilikçi ve verimli bir zemin oluşturarak genom dizileme çalışmaları için yeni fırsatlar sunmuştur. Mevcut ikinci nesil dizileme (SGS) teknolojilerine paralel olarak, teknolojinin geliştirilmesiyle birlikte, yeni nesil tek-molekül dizileme, yani üçüncü nesil DNA dizileme (TGS) teknolojileri de hızla gelişmektedir. Üçüncü nesil DNA dizileme teknolojileri üzerine geliştirilen bazı yaklaşımlar göstermektedir ki, ileri derecede kullanılan teknoloji ve ürünleri, DNA dizileme konusunda araştırmacılara başka hiçbir deneysel yöntem ile elde edilemeyecek kadar zengin ve özgün bilgi sağlamaktadır. Üçüncü nesil DNA dizileme teknolojilerinin herhangi bir canlıya ait bütün bir genomu, bir günden daha az bir sürede, çok daha az maliyetle, tam, doğru ve daha uzun okuma zincirleri oluşturarak dizileme kapasitesine sahip olduğu yapılan pek çok çalışmayla gösterilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** DNA dizileme, İkinci nesil DNA dizileme, Üçüncü nesil DNA dizileme

## 1. DNA sekanslama ve tarihsel gelişimi

DNA dizi analizi, genom yapısı ve genetik kontrol mekanizmaları hakkında birçok bilgi edinmemizi sağlamıştır. Bir organizmadan çok miktarda saf DNA elde edilmesini sağlayan rekombinant DNA tekniklerinin gelişmesiyle birlikte DNA dizi analizi yöntemleri de gelişme göstermiştir. 1960'lı yıllarda başlayan DNA dizi analizi ile ilgili araştırmalar şu şekilde gelişmiştir [1]. 1965 yılında Robert HOLLEY; 74 nükleotitlik bir tRNA molekülünün dizi analizini yapmıştır. 1977'de Allan MAXAM- Walter GİLBERT ve Frederick SANGER tarafından iki farklı DNA dizi analizi yöntemi bulunmuştur. 1982'de Akiyoshi WADA; DNA dizi analizinin otomatik yollarla yapılmasını önermiştir ve robotlar geliştirilmeye başlanmıştır. 1986 yılında Kalifornia Teknoloji Enstitüsü'nden (Caltech) Leroy HOOD ve Llyod SMİTH tarafından DNA dizi analizleri için, tam otomatik bir makine geliştirilmiştir. 1990'da Edward UBERBACHER tarafından gen tespit programı, GRAIL kullanılmaya başlanmıştır. 1992 yılında 21. kromozomun DNA dizi analizi tamamlanmıştır. Craig VENTER, Claire FRASER ve Hamilton SMITH 1995 yılında; *Haemophilus influenzae*'ya ait ilk DNA dizisini yayınlanmışlardır. 1996 yılında *S.cerevisiae*'nin DNA dizisi yayımlanmıştır. 1998'de Sanger Center ve Washington Üniversitesi, *Caenorhabditis elegans*'ın DNA dizisini açıklamışlardır. 1999 yılında bilim adamları tarafından insanın 22. kromozomunun DNA dizisi tamamlanmıştır. 2000 yılında Celera ve birlikte çalıştıkları üniversiteler tarafından *Drosophila melanogaster*'in DNA dizisi açıklanmıştır. 2000 yılı Haziran ayı içinde insan genom projesinin ve insan gen haritası taslağının tamamlandığı açıklanmıştır. Yine 2000 yılında *Arabidopsis thaliana*, DNA dizisi açıklanan ilk bitki olmuştur. 2003 yılında ise David PAGE ve ekibi cinsiyet kromozomu olan Y kromozomunun dizi analizini tamamlamışlardır [2].

## 2. DNA dizileme teknolojileri

### 2.1 Birinci nesil DNA dizileme teknolojisi (FGS)

Birinci nesil dizileme 1977 yılında Maxam ve Gilbert tarafından (kimyasal kırılma yöntemi) geliştirilmiştir ve 1977'de Sanger ve ekibi bu yönteme paralel olarak zincir sonlanma metodunu uygulamışlardır. Mevcut birinci nesil dizilemelerden Sanger dizileme metodu teknik açıdan daha az karmaşık ve çoğaltma işlemlerinde daha makuldür. Bugün uygulanan Sanger dizileme metodu için örnek hazırlanması esnasında, farklı boyutlardaki DNA fragmentlerinin her biri, aynı konumdan başlayarak üretilmiştir. Her fragment, belli bazlara karşılık gelen 4 tane floresandan biriyle etiketlenen belirli bir baz ile sonlanmaktadır. Sonra tüm fragmentler kapiller elektroforez üzerinden boylarının sırasına göre paylaşılır. Son baz ile ilgili bilgiler orijinal dizileme ile belirlenmektedir. Bu metot yaklaşık 800 baz olan bir okuma uzunluğu ile sonuçlanır ama 1000 baza kadar da genişletilebilir. Bu yaklaşımın tam otomatik uygulanması insan genomunun orijinal dizilemesi için önemli bir dayanak iken bu uygulama insan genom projesine başlanıldığı zamanlarda insan genomunun sekansının yaklaşık 3 milyar dolar gibi yüksek bir maliyet ve bu proje için yaklaşık 10 yıl kadar süreç gerektiğini öngörmekteydi [3-9].

### 2.2 İkinci nesil DNA dizileme teknolojisi (SGS)

İkinci nesil DNA dizileme teknolojisi (SGS), birinci nesil dizilemenin yüksek maliyetine ve düşük verimine yanıt olarak 2005 yılında uygulanmaya başlanmıştır. Bu sorunu gidermek için SGS uygulamalarıyla, yüksek miktarda DNA molekülü dizileyerek daha yüksek verim elde edilmiştir. Birçok SGS teknolojileriyle, özdeş iplikçiklerin yüz binlercesi belirli konumda verilen ve tekrarlı yıkama ve tarama işlemlerinden oluşan bir süreçte belirlenmiştir.

Yıkama ve tarama işlemi birbirini takip eden süreçler içerisinde kullanılan bazı reaktifleri içerir. Floresan boyalarla etiketlenmiş nükleotitler DNA ipliklerindeki sıraya göre birleştirilirler ve birleşme reaksiyonu durur. Sonraki aşamada aşırı reaktifler yıkanıp temizlenir ve birleştirilmiş bazları belirlemek için tarama yapılır. Süreç başa döner ve daha sonraki 'yıkama ve tarama döngüsü' için DNA kalıplarını, reaktifleri ve etiketlenmiş nükleotitleri hazırlar. Illumina'nın HiSeq 2000 aracı, tek bir döngüde, 300 ya da daha fazla gigabazlık dizi verisi üretebilir. SGS metodları genelde yüksek miktarda tarama ve yıkama döngüsü isteğinden dolayı uzun sürmektedir (günler alabilir). Ayrıca her bir baz ilavesi için verim, her bir baz eklendiğinde daha fazla uyumsuz hale gelmektedir. Bu uyum kaybı yanlış baz eşlemelerine neden olur ve okuma uzadıkça sekans hatası ortaya çıkar. Yüksek miktarda DNA molekülü üretmek amacıyla PCR amplifikasyonu gereklidir. Amplifikasyon süreci amplifikasyon sapması kadar kalıp sekans hatasını da ortaya koyar. Ayrıca çoğaltma süreci örnek hazırlamayla ilgili zaman ve karmaşıklığı artırır. Sonuç olarak her çalıştırmada SGS teknolojileri tarafından başarılan yüksek verimlilik, özellikle Sanger dizileme metodu ile karşılaştırıldığında son derece bilgilendirici veriler oluşturmaktadır. Birinci nesil dizileme ve SGS teknolojileri; dizileme çalışmalarında çok fazla gelişmeler ortaya koymuştur. Fakat kullanılan bazı ek çalışmalar (PCR, Wash and Scan/Yıkama ve Tarama) gereksinim duyulan pek çok

kimyasal ya da reaktif ve yüksek maliyetin yanı sıra çok daha fazla vakit harcanması yeni bir teknolojiye ihtiyaç duyulduğunun işaretlerini vermekteydi [10-12].

### 2.3 Üçüncü nesil DNA dizileme teknolojisi (TGS)

Birinci ve ikinci nesil DNA dizileme (SGS) teknolojileri genomik alanında devrim yaratan bir yol açmıştır. Çok sayıda bilimsel çalışmada şaşırtıcı gelişmelere sebep olmuştur ki bunlar; tüm canlı genom dizisinin anlaşılması ve hangi bilgileri kodladığı, hangi bilgileri taşıdığı, dahası metilasyon düzeylerinin, transkripsiyonun, protein ve DNA'nın aralarındaki etkileşimlerin tam anlaşılması açısından yapılan çalışmalardır. Bununla birlikte üçüncü nesil DNA dizileme (TGS) teknolojileri, mevcut dizileme teknolojilerine yenilikçi, verimli ve daha az maliyet gerektiren bir zemin oluşturarak genom dizileme çalışmaları için yeni fırsatlar sunmuştur. Yeni nesil tek zincir molekül dizileme teknolojisi (TGS), daha uzun dizileme ve okuma için potansiyel oluştururken, aynı zamanda maliyeti düşürmekte ve bütün bunlar mevcut dizileme için harcanan vakti fazlasıyla azaltmaktadır. Küçük bir DNA parçasından çok sayıda DNA'nın üretilmesi tekniği olan PCR metoduna dayalı ya da PCR tekniklerinden köken almış 2. nesil DNA dizileme teknolojilerinden farklı olarak, 3. nesil DNA dizileme teknolojileri, sekansı yapılacak olan DNA parçasının ya da komple bir DNA şablonunun, katı bir yüzeye tutturularak ya da sabitlenerek veya bir gözenek hattı boyunca hareketi sağlanarak, sentez safhasında çeşitli teknolojiler sayesinde görüntülenmesi, tanınması, tekrardan okunarak uzama zincirlerine eklenmesi esasına göre çalışmaktadır [11]. Böylece PCR metodlarında karşılaşılan pek çok sorunun üstesinden geldiği görülmüştür. Daha da önemlisi yeni nesil dizileme teknolojisi yüksek DNA polimeraz işlevi ile yüksek katalitik oranlarda çalışma potansiyeline sahip olmasıyla DNA dizileme esnasında, okuma oranını on bazdan on binlerce baza yükseltirken harcanan zamanı günlerden saatlere hatta dakikalara indirmektedir [9, 13]. DNA dizileme teknolojileri arasındaki farklar tablo 1. de ayrıntılı olarak verilmiştir.

Mevcut dizileme teknolojilerine karşılık üçüncü nesil dizileme teknolojilerinin avantajları;

- (i) Daha yüksek verim,
- (ii) Daha hızlı geri dönüş süresi (örn. dakika içinde yüksek metilatlı genom dizisinin elde edilmesi),
- (iii) Uzun okuma oranları (hatta tüm kromozom),
- (iv) Yüksek uzlaşma doğruluğu (başlangıç materyalinin doğru çoğaltılması),
- (v) Küçük miktarlarda başlangıç materyali (tek bir molekülün sekanslama için yeterli olması),
- (vi) Düşük maliyetli olmasıdır.

### 3. Üçüncü nesil DNA dizi analizi

Birinci ve ikinci nesil DNA dizileme teknolojilerinde sekanslama işlemi; numune hazırlanması, fiziksel sekanslama ve yeniden bir araya getirme (yeniden montaj) gibi üç temel aşamadan oluşur. İlk adım olan örneğin hazırlanması, hedef genomun küçük parçalara kırılması ya da ayrılmasıdır. Örnek DNA miktarına bağlı olarak, bu fragmentler çeşitli moleküler yöntemler kullanılarak birden çok kopya halinde amplifiye edilebilir. Fiziksel sekanslama aşamasında her bir parçadaki bireysel bazlar tespit edilir ve tanımlanan bu bazların sayısı okuma uzunluğu olarak tanımlanır. Yeniden birleştirme aşamasında biyoformatik yazılımlar kullanılarak orjinal genom dizisine uygun olarak tanımlanan bazların bitişik olarak monte edilmesi ve örtüşmesi sağlanır [9].

Üçüncü nesil DNA dizileme yani tek-zincir molekül dizileme (SMS; Single-Molecule Sequencing) teknolojisi 3 farklı kategoride ele alınır.

1. DNA Polimeraz kullanılarak, DNA'nın tek ipliğini kullanarak yapılan sentezleme (SBS; Sequencing by synthesis/Sentez yoluyla dizileme teknolojisi).
2. Sentezlenecek olan DNA moleküllerinin nano gözenekler etrafında konumlanması, pozisyonu ve nano gözeneklerden geçerken bu bazların tanımlanması, tespit edilmesi. (Nanopore-Sequencing/Nano-Gözenek-Dizileme Teknolojisi).
3. Doğrudan görüntüleme teknikleri ile nano gözeneklerden geçen DNA moleküllerinin (bazların) görüntülenmesi.

Bu teknolojilerin her biri DNA dizileme için yeni yaklaşımlar sunarken aynı zamanda özel uygulamalarıyla ilgili avantaj ve dezavantajlara sahiptir [9].

Tablo 1. DNA dizileme teknolojileri arasındaki farklar [9]

	1. Nesil	2. Nesil	3. Nesil
<b>Gerekli Teknoloji</b>	Sentez yoluyla dizileme (SBS)	Sentez yoluyla dizileme (SBS), Yıkama ve tarama	Sentez yoluyla dizileme (SBS) ya da direkt olarak DNA molekülüne fiziksel müdahale
<b>Kullanılan kalıp DNA</b>	DNA'nın parçalara ayrılmış kopyaları	DNA'nın parçalara ayrılmış kopyaları	DNA'nın tek zinciri
<b>Okuma Doğruluğu</b>	Yüksek oran	Yüksek oran	Yüksek oran
<b>Okuma Uzunluğu</b>	800-1000 baz çifti	Kısa (Sanger metoduna göre)	1000 baz çifti ve daha fazlası
<b>Verim</b>	Düşük	Yüksek	Yüksek
<b>Maliyet</b>	Yüksek	Yüksek	Düşük
<b>RNA Dizileme</b>	cDNA kullanarak	cDNA kullanarak	cDNA kullanarak ya da direkt olarak RNA molekülü
<b>Zaman</b>	Saatler	Günler	Dakikalar
<b>Örnek Hazırlama Şekli</b>	Kısmen karmaşık PCR'a gerek yok	Karmaşık PCR'a gerek var	Teknolojisine göre basit-karmaşık PCR'a gerek yok

### 3.1 Üçüncü nesil DNA dizileme teknolojileri için geliştirilen teknolojik yaklaşımlar

#### 3.1.1 Tek iplikli DNA molekülünün Real Time sekansı

3. nesil DNA dizileme teknolojileri için geliştirilen ilk yaklaşım, Pasifik Biosciences tarafından gerçekleştirilen, tek iplikli DNA molekülünün Real Time (SMRT) sekanslama yöntemi ile sentezlenmesidir. Pasifik Biosciences'in geliştirmiş olduğu tek iplikli DNA molekülünün Real Time (SMRT) ile dizileme yaklaşımı DNA polimeraz enziminin hız ve üretim kapasitesine doğrudan etki ederek 2. nesil DNA dizileme teknolojilerinin birçok eksikliğini tamamlamıştır.

Fakat yine de Real Time ile yapılan DNA sentezinin direkt gözlemine etkinleştirmek için üstesinden gelinmesi gereken iki önemli engel vardır:

1. Kalıp DNA şablonuna göre ilgili bazın birleştirilmesinde doğru bazın eklenmesi için ihtiyaç duyulan sinyal-eşik değerinin aşılması esnasındaki gözlemlenebilir seviyenin enzim kontrolü altında sınırlandırılabilmesi,
2. Sentez işlemi esnasında nükleotitlerin kalıp DNA'ya göre doğru sırayla sentezlenmesini sağlamak amacıyla nükleotitlerin etiketlenmesinde kullanılan nükleotit boyalarının birleştirme esnasında ayrılırken yaydıkları ışınlar sınırlandırılan seviyede kalmayabilir ve sinyal eşik değeri seviyesini bozabilir.

DNA sentezi boyunca büyük bir nükleotit havuzundan nükleotitlerin tek tek alınarak doğru sıraya göre birleştirilmesi ve karşılaşılan bu iki problemin çözülebilmesi için, sıfır mod dalga (Zero mode waveguides/ZMW) teknolojisi geliştirilmiştir. Sıfır-mod dalga boyu (ZMW) teknolojisi, basit bir mikrodalga fırının kapağındaki koruyucu ekranının (tabaka) var olma prensibinde çalışmaktadır. Bu ekran, mikrodalgaların dalga boyundan çok daha küçük olan porlara sahiptir. Bu porlar, sahip oldukları boyutlar sayesinde çok daha uzun dalga boylarını geçirmeyerek ekrana nüfuz etmesini önlemektedir. Böylece çeşitli dalga boylarına sahip ışınların hepsinin değil istenilen dalga boyuna sahip ışınların geçmesi sağlanır. Ancak daha kısa dalga boylu ışınlar bu porlardan geçerek ekrana ulaşabilmektedir. Tıpkı mikro dalga fırında yemek pişerken çeşitli dalga boylarındaki bütün ışınların değil sadece yemeğin piştiğini anlayabildiğimiz ve görebildiğimiz dalga boyundaki ışınların geçtiği gibi. ZMW teknolojisi de DNA sekanslama için benzer şekilde dizayn edilmiştir. ZMW porları cam tabaka üzerine monte edilmiş 100 nm'lik metal filminden yapılmış, nanometre seviyesinde çapları olan porlardır. ZMW'nin küçük boyutlu olması, yaklaşık olarak 600 nm. dalga boyuna sahip görülebilen lazer ışınlarının ZMW boyunca ilerlemesini, içeri girmesini engeller. Ama buna rağmen girebilen ışınlar ise ZMW teknolojisi sayesinde katlanarak azalır. Bu yüzden sadece 30 nm'nin altındaki dalga boylarının aydınlanabilmesi için ZMW'nin içinde cam tabaka boyunca lazer ışın aydınlatması/ışınması yapılır. Bu ışına sadece ZMW'nin porları içindeki etiketlenmiş nükleotitleri etkilerken ZMW dışındaki nükleotitleri etkilemez. Her bir ZMW'de bir tek DNA polimeraz molekülü, biyotin-streptavidin etkileşimini kullanılarak cam tabaka

yüzeyine tutturulur. Farklı renklere florefor adlı boya ile etiketlenmiş olan her bir nükleotit gerekli konsantrasyonlarda ZMW'nin içinde DNA dizisi üzerine doğru hareket eder. Mikro saniyeler içinde meydana gelen bu yayılma hareketinde etiketlenmiş olan nükleotitler DNA polimerazın etrafını sarar. Doğru nükleotit DNA polimeraz tarafından tanındığı zaman milisaniyelerde gerçekleşen DNA zincir uzaması işlemiyle birleştirilir. Birleştirme olayını takiben sinyal aniden geri döner ve işlem DNA polimerazın saniyeler içinde birleştirme süreciyle tekrarlanır. ZMW teknolojisi bahsettiğimiz ilk engeli bu şekilde aşabilmektedir. İkinci engelin aşılmasına gelindiğinde ise bütün 2. nesil DNA dizileme teknolojilerinde bu tip nükleotit etiketleyici boyalar direkt olarak baza bağlanmaktadır. Nükleotit boyalarının büyüklüğü ve birleştirme esnasında ayrılırken yaydıkları ışınlar DNA polimeraz aktivitesini etkilemektedir. Fakat 3. nesil DNA dizileme teknolojileri üzerine geliştirilen tek iplikli DNA molekülünün Real Time (SMRT) ile sekans yaklaşımında, nükleotit etiketleyici boyalar bazların aksine fosfat zincirlerine bağlanmaktadır. Doğal bir süreç içerisinde etiketlenmiş nükleotit DNA zincirine bağlandığında etiketleyici bu boyalar, DNA polimeraz tarafından fosfat zincirinden ayrılır. Ayrılan bu boyalar difüzyona uğrayarak herhangi bir etki yaratmadan ortamdaki uzaklaştırılırlar. Böylece etiketleyici boyalardan kaynaklanan sorun da ortadan kalkmış olur. Tek iplikli DNA molekülünün Real Time (SMRT) ile sekans yaklaşımında, bazı ekipmanlara, primerlere, reaktiflere ihtiyaç duyulması ve bunların yüksek maliyeti, örnek hazırlamanın zor olması bu teknolojinin dezavantajı iken 2. nesil DNA dizileme teknolojilerinde var olan yıkama ve tarama aşamalarının olmaması, harcanan zamanın gün seviyesinden dakikalara indirmesi bu teknolojinin avantajlarıdır. Ek olarak pek çok 2. nesil DNA dizileme teknolojilerinin temelini oluşturan klasik PCR çalışmalarına ihtiyaç duyulmaması da bu teknolojinin avantajlarıdır [9, 14-16].

### **3.1.2 Floresan rezonans enerji aktarımını (FRET) kullanan Real-Time DNA sekanslama yaklaşımı**

Visigen biyoteknoloji sistemleri, DNA polimerazın florefor boylarıyla etiketlenmiş nükleotitlerin yaydığı floresan rezonans enerji aktarım (FRET) sinyallerini tanıması üzerine yenilikçi yaklaşımlara sunmuştur. Nükleotitlerin birleştirilmesinden sonra nükleotitler üzerindeki florefor etiketler ayrılır. Bu tür bir yaklaşım Helicos teknolojisi üzerinde bir iyileşme olarak kabul edilebilir ve saniyede milyonlarca bazı taşıma potansiyeline sahip yüksek teknolojiler için imkân verebilmektedir. Fakat şuan için bunun ölçümü çok zordur. Uygulanabilirliğini gösteren bilimsel bir çalışma ve yayın henüz bulunmamaktadır [9].

### **3.1.3 Elektron mikroskopu (TEM)'na dayalı DNA sekanslama yaklaşımı**

Halcyon Moleküler; DNA ipliğindeki nükleotitlerin kimyasal yapılarına bakılarak tek tek tanınması ve direkt görüntülenmesi yönünde elektron mikroskopunu kullanan ilk yaklaşımın sahibidir. Halcyon Moleküler, TEM teknolojisinin ötesinde direkt olarak elektron mikroskopu kullanarak görüntülenen DNA dizisindeki nükleotitlerin fonksiyonel iğneler kullanılarak tek tek bir substrat üzerine tutturulması yönünde destekleyici teknolojiler geliştirmiştir. Ancak şimdiye kadar bu teknolojinin kullanıldığı herhangi bir çalışma ya da yayın bulunmamaktadır. Fakat bu öngörünün başarılı olması halinde çok daha uzun okuma zincirlerini çok daha az maliyetle elde etmek mümkün olacaktır.

ZS Genetics'in yaklaşımına göre, DNA dizisindeki etiketlenmiş tek bir nükleotit, yüksek çözünürlüklü (<angstrom) elektron mikroskopu yardımıyla diğer etiketlenmiş nükleotitlere göre boyut ve yoğunluk farkına dayalı olarak tanınarak belirlenir. ZS Genetics 1.7 milyar oranında bazı içeren bir çalışmada günlük 10.000-20.000 bazı okunabileceğini öngörmektedir. Ön görülen bu 3. nesil dizileme teknolojisi de diğer 3. nesil teknolojiler gibi daha az maliyetle çok daha fazla okuma zincirlerini elde etmeyi amaçlamaktadır. Fakat henüz bu teknolojinin uygulanabilirliğine dair herhangi bir çalışma ve yayın bulunmamaktadır [9, 17].

### **3.1.4 Taramalı-elektron mikroskopu (STM/SEM)'na dayalı DNA sekanslama yaklaşımı**

Reveo; IBM'nin DNA transistor yaklaşımıyla bağlantılı olarak geliştirdiği teknolojiye DNA iletken bir yüzey üzerine yerleştirilir ve taramalı elektron mikroskop uçları ve buna bağlı olarak tünel akım ölçümü kullanılarak bazı belirlenir. STM'nin uçları bıçak ağız şeklindedir ve nano ölçekli boyutlara sahiptir. Bu teknolojinin uygulanmasındaki hedef DNA molekülünü gerek ve sınırlandırarak tünel akım ölçümü sayesinde nükleotitlerin tanınmasıdır. Bu 3. nesil dizileme teknolojisi de diğer 3. nesil teknolojiler gibi daha az maliyetle çok daha fazla okuma zincirlerini çok daha hızlı olarak elde etmeyi amaçlamaktadır. Ayrıca bu teknoloji nükleotitlerin etiketlenmesi olayını da ortadan kaldırmaktadır. Fakat öngörülen bu teknolojinin uygulanabilirliğine dair herhangi bir çalışma ve yayın bulunmamaktadır [9, 18].

### 3.1.5 Nanopor teknolojisi ile DNA sekanslama

Pek çok nanopor dizileme teknolojisi, DNA molekülünün ya da nükleotitlerin bir pordan geçmesi ve nükleotitlerin bu geçiş esnasındaki elektrik akımı ve optik sinyal alıcıları üzerine etkisinin gözlemlenmesi sayesinde bazların belirlenmesi esasına dayanır. Bu teknoloji tek zincirli DNA molekülünü kullandığı için çok çok az miktarlarda bile çok daha hızlı çalışma potansiyeline sahiptir. Hem mühendislik sonucu elde edilmiş proteinler kullanılarak imal edilmiş hem de tamamıyla sentetik olarak imal edilen nanoporlar, sürekli geliştirilmekte olup her geçen gün teknolojik sevipleri artmaktadır. Özellikle de matrix destekli çok ince yapıları nanoporlar ve karbon yapıları nanotüpler, bu teknolojiye birer örnektir [19-21].

### 3.1.6 Tek zincirli DNA molekülünün doğrudan elektriksel algılanması

Oxford Nanopor, DNA sekanslama için üç doğal biyolojik moleküle dayanarak çalışan bir sistem geliştirmiş ve bu sistemi ticari hale getirmiştir. Biyolojik nanoporlar modifiye edilmiş & -hemolizinden yapılmış dış yüzeyinde ekzonükleaz aktivitesine sahip yapılardır. Bir sentetik siklodekstrin sensör molekülü de kovalent bağ ile porun iç yüzeyine bağlanmıştır. Bu sistem DNA'nın yüklendiği ve ekzonükleaz aktivitesinin olduğu tarafta tuz konsantrasyonundaki değişim sayesinde elektrik akımının geçtiği bir lipid tabakası içermektedir. Ekzonükleaz aktivitesi ile nükleotitler tek tek ayrılır. Bu nükleotitlerin ayrılması; pordan geçerken nükleotitlerin iyonik özellikleri ve karakteristik yapılarına göre olur. Ayrılan bu nükleotitler de tek tek tanımlanır. Yüksek sıcaklıkta bu sistemde doğal lipid tabakalarını kullanarak bu işlemlerin gerçekleşmesi ve güvenilir verimliliğin alınması zor olabilir. Fakat sentetik membranlar ve transistörlü nanoporlar geliştirilirse bu sorun aşılabilir. Diğer 3. nesil DNA dizileme teknolojilerinde de olduğu gibi bu teknolojiye de uzun okuma zincirleri, düşük maliyetle yüksek okunabilirlik ve teknolojinin optik aksamaların kontrolünde değil elektroniğin kontrolünde olması avantajlarındandır [22-24].

### 3.1.7 MspA'lı nanopor teknolojisi ile DNA sekanslama

Bu yaklaşım tam DNA üzerinde biyolojik nanopor teknolojisini kullanmayı amaçlamaktadır. Oxford Nanopor teknolojilerinden farklı olarak *Mycobacterium smegmatis* adlı bakteriden elde edilen ve daha kısa blokaj bölgesine sahip *Mycobacterium smegmatis* Porin A (*MspA*) proteini, alfa hemolisin porlarındaki eksonel çözünürlük sınırlamasını bloke ederek DNA molekülünün ayrılmadan daha fazla çözünürlükte bu porlardan geçmesini sağlamakta ve bu geçiş esnasında da DNA molekülünün etkileri ölçülmektedir. *Mycobacterium smegmatis* Porin A (*MspA*) protein yapıları porlardan tek iplikli DNA molekülü tanımlanan çift iplikli DNA molekülüne göre, yavaşça geçerken içerdiği bazların tanımlanması yapılmaktadır. Bu teknolojiye tek iplikli DNA molekülünün doğrudan ölçülüyor olabilmesi etkileyici bir avantajı iken porlardan geçiş esnasında tamamlayıcı bilgi olarak çift iplikli DNA'ya ihtiyaç duyuyor olması bu teknolojinin aşması gereken engellerden biridir. Bu engel aşıldığı takdirde, laboratuvarlarda en çok kullanılan yöntemin bu olacağı da öngörülmektedir [25].

### 3.1.8 Optik okunabilir nanopor teknolojisi ile DNA sekanslama

Nanopor teknolojisindeki en önemli zorluklardan biri çok sayıda nanoporun eş zamanlı olarak okunması ve görüntülenmesidir. Bu zorluğu aşmak için çok sayıda nanoporların eş zamanlı işlenebilmesini sağlayan multipor optik okuma sistemi geliştirilmiştir. Bu yaklaşımda ilk olarak 4 farklı baz arasındaki kontrast, DNA içerisindeki her bir bazın kendine özgü karakter yapısını alması için biyokimyasal bir süreç ile artırılır. Daha sonra iki farklı floresan etiketli moleküller işaretçiler DNA içindeki bu bazlara bağlanır. Bu işaretçiler DNA moleküllerinin nanoporlardan geçişi esnasında ayrılır ve ayrılırken floresan ışınlar yayarlar. Yayılan bu ışınlar içe yansımaları floresan mikroskop yardımıyla yüksek çözünürlüklü CCD (Charge Coupled Device) kamera sistemi ile belirlenir. Kesin, doğru ve uzun okuma zincirlerinin elde edilmesi ve düşük maliyetle yüksek okunabilirlikte olması bu teknolojinin avantajlarıdır. Fakat süreç içindeki biyokimyasal olaylar bu teknolojinin dezavantajını oluşturmaktadır [9, 26].

### 3.1.9 Transistör aracılı DNA sekanslama

IBM, tek zincirli DNA molekülündeki bazların elektronik olarak tanınmasına olanak sağlayan, nano yapıları dizileme cihazını geliştirmiştir. Nano yapıların nanometre büyüklüğünde gözenekleri vardır. Bu gözeneklerin yüzeyleri metal ve yalıtkan materyalden yapılmış eksensel tabakalı alternatif tabakalardan oluşmaktadır. Tek iplikli DNA molekülü transistörün elektrotları tarafından kontrol edilen gözeneklerden geçerken monitörize edilir. Hızlı yapılması, uzun okuma zincirlerinin oluşumu, düşük maliyetli olması bu teknolojinin avantajlarındandır. Bu teknolojiye okuma uzunluğu transistör başına saniyede 500 milyar

baz olarak hesaplanmış ve bu uzunlukta okumanın gerçekleşmesi öngörülmektedir. Diğer bazı 3. Nesil DNA dizileme teknolojilerinde de olduğu gibi süreç içerisinde tanıma işlemi için etiketleme işlemi yapılmıyor olması herhangi bir optik materyale ihtiyaç duyulmaması ve çok daha düşük maliyetlere yapılıyor olması da bu teknolojinin avantajlarını oluşturmaktadır [27-29].

#### 4. Sonuç

Üçüncü nesil DNA dizileme teknolojisinin geliştirilen teknolojik yaklaşımlar sayesinde kanıtlanabilir ve uygulanabilir olduğunu ayrıca ikinci nesil DNA dizileme teknolojisi üzerine çok daha fazla yenilikler ve kolaylıklar getirdiğini söyleyebiliriz.

Üçüncü nesil DNA dizileme teknolojisi sayesinde yapılan araştırmalar sonucunda çalışılan örnek hakkında çok daha fazla bilgi elde edilmiş bunun sonucu olarak da karmaşık canlılar hakkında daha fazla bilgi sahibi olunmuştur. Elde edilen bilgiler bu canlılarla ilgili hastalıklar hakkında da bilgi edinilmesini sağlamıştır.

İkinci nesil DNA dizileme teknolojileri, DNA dizileme konusunda insanoğluna çok fazla bilgiler sunmuş ve bunlara bağlı olarak da dizileme konusunda yeni teknolojilerin gelişmesine olanak sağlamıştır. Özellikle sağlık konusunda karşılaşılan hastalıklara yönelik yürütülen çalışmalarda ikinci nesil DNA dizileme teknolojileri fazlasıyla ilerlemeler kaydetmiştir. Örneğin, tümörlü dokularda olası meydana gelen varyasyonların tespiti ve farklı kanser tiplerinin ortaya çıkarılmasında büyük faydalar sağlamıştır. Bütün bu uygulanabilirlik ve faydalarına rağmen ikinci nesil DNA dizileme teknolojilerinin yerine neden üçüncü nesil DNA dizileme teknolojisine ihtiyaç vardır ya da niçin bu teknoloji icat edilmiştir. İşte bunun cevabı yine teknoloji ile açıklanabilmektedir. Hızla gelişen teknolojiye paralel olarak geliştirilen üçüncü nesil DNA dizileme teknolojileri, ikinci nesil DNA dizileme teknolojilerinin yaptığı her şeyi aynı şekilde yapabilmektedir. Fakat üçüncü nesil DNA dizileme teknolojisi herhangi bir canlıya ait bütün bir genomu bir günden daha az bir sürede çok daha az maliyetle, tam, doğru ve daha uzun okuma zincirleri oluşturarak dizileme kapasitesine sahiptir.

Üçüncü nesil DNA dizileme teknolojisi ve diğer teknolojiler sayesinde canlılar hakkında özellikle de insanlar konusunda daha fazla bilgiler daha kısa sürede daha doğru ve net bir şekilde elde edilecek ve bu bilgiler doğrultusunda karşılaşılan hastalıkların çoğunun tedavisi çok daha kolay bir şekilde yapılacaktır. Özellikle ilaç ve aşı teknolojilerinde artık kişiye özel ilaçlar ve aşılarda kişinin kendi genomuna göre üretilebileceği için çok daha kısa sürede tedavi gözlenebilecektir. Aynı şekilde hastalıklardan korunma yolunda da kişinin daha önceden belirlenen genomuna uygun ilaç ve aşılarla koruma tedavileri verilecek ve bunun doğrultusunda hastalanma diye bir şey kalmayacaktır. Kısacası, ileri yaşam bilimleri ve teknolojinin kullanıldığı her alanda bu teknolojilerden faydalanmak mümkün olacaktır.

#### 5. Kaynaklar

- [1] Zülal, A. (2001). İnsan Genomu kalıtım şifresinin peşinde 136 yıl. Tübitak Yayınları, 5-11.
- [2] Klug, S.W., Cummings, W.R. (2000). Concept of Genetics, Prentice Hall, New Jersey 745.
- [3] Sanger, F. and Coulson, A.R. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. J. Mol. Biol., 94, 441-448.
- [4] Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 74, 5463-5467.
- [5] Maxam, A.M. and Gilbert, W. (1977). A new method for sequencing DNA. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 74, 560-564.
- [6] Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., Smith, H.O., Yandell, M., Evans, C.A., Holt, R.A. et al. (2001). The sequence of the human genome. Science, 291, 1304-1351.
- [7] Hert, D.G., Fredlake, C.P. and Barron, A.E. (2008). Advantages and limitations of next-generation sequencing technologies: a comparison of electrophoresis and non-electrophoresis methods. Electrophoresis, 29, 4618-4626.
- [8] Schloss, J.A. (2008). How to get genomes at one ten-thousandth the cost. Nat. Biotechnol., 26, 1113-1115.
- [9] Schadt, E. E., Turner, S., and Kasarskis, A. (2010). A window into third-generation sequencing. Human Molecular Genetics, Vol. 19.
- [10] Schatz, M.C., Delcher, A.L. and Salzberg, S.L. (2010). Assembly of large genomes using second-generation sequencing. Genome Res., 20, 1165-1173.
- [11] Whiteford, N., Skelly, T., Curtis, C., Ritchie, M.E., Lohr, A., Zaraneck, A.W., Abnizova, I. and Brown, C. (2009). Swift: primary data analysis for the Illumina Solexa sequencing platform. Bioinformatics, 25, 2194-



- 2199.
- [12] Metzker, M.L. (2010). Sequencing technologies—the next generation. *Nat. Rev. Genet.*, 11, 31–46.
  - [13] Shendure, J. and Ji, H. (2008). Next-generation DNA sequencing. *Nat. Biotechnol.*, 26, 1135–1145.
  - [14] Eid, J., Fehr, A., Gray, J., Luong, K., Lyle, J., Otto, G., Peluso, P., Rank, D., Baybayan, P., Bettman, B. et al. (2009). Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. *Science*, 323, 133–138.
  - [15] Levene, M.J., Korlach, J., Turner, S.W., Foquet, M., Craighead, H.G. and Webb, W.W. (2003). Zero-mode waveguides for single-molecule analysis at high concentrations. *Science*, 299, 682–686.
  - [16] Flusberg, B.A., Webster, D.R., Lee, J.H., Travers, K.J., Olivares, E.C., Clark, T.A., Korlach, J. and Turner, S.W. (2010). Direct detection of DNA methylation during single-molecule, real-time sequencing. *Nat. Methods*, 7, 461–465.
  - [17] Krivanek, O.L., Chisholm, M.F., Nicolosi, V., Pennycook, T.J., Corbin, G.J., Dellby, N., Murfitt, M.F., Own, C.S., Szilagy, Z.S., Oxley, M.P. et al. (2010). Atom-by-atom structural and chemical analysis by annular dark-field electron microscopy. *Nature*, 464, 571–574.
  - [18] Blow, N. (2008). DNA sequencing: generation next-next. *Nat. Methods*, 5, 267–274.
  - [19] Bayley, H. (2010). Nanotechnology: holes with an edge. *Nature*, 467, 164–165.
  - [20] Liu, H., He, J., Tang, J., Pang, P., Cao, D., Krstic, P., Joseph, S., Lindsay, S. and Nuckolls, C. (2010). Translocation of single-stranded DNA through single-walled carbon nanotubes. *Science*, 327, 64–67.
  - [21] Luan, B., Peng, H., Polonsky, S., Rossnagel, S., Stolovitzky, G. And Martyna, G. (2010). Base-by-base ratcheting of single stranded DNA through a solid-state nanopore. *Phys. Rev. Lett.*, 104, 8103.
  - [22] Howorka, S., Cheley, S. and Bayley, H. (2001). Sequence-specific detection of individual DNA strands using engineered nanopores. *Nat. Biotechnol.*, 19, 636–639.
  - [23] Clarke, J., Wu, H.C., Jayasinghe, L., Patel, A., Reid, S. and Bayley, H. (2009). Continuous base identification for single-molecule nanopore DNA sequencing. *Nat. Nanotechnol.*, 4, 265–270.
  - [24] Stoddart, D., Heron, A.J., Mikhailova, E., Maglia, G. and Bayley, H. (2009). Single-nucleotide discrimination in immobilized DNA oligonucleotides with a biological nanopore. *Proc. Natl Acad. Sci USA*, 106, 7702–7707.
  - [25] Derrington, I.M., Butler, T.Z., Collins, M.D., Manrao, E., Pavlenok, M., Niederweis, M. and Gundlach, J.H. (2010). Nanopore DNA sequencing with Msp.A. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 107, 16060–16065.
  - [26] McNally, B., Singer, A., Yu, Z., Sun, Y., Weng, Z. and Meller, A. (2000). Optical recognition of converted DNA nucleotides for single-molecule DNA sequencing using nanopore arrays. *Nano Lett.*, 10, 2237–2244.
  - [27] Polonsky, S., Rossnagel, S. and Stolovitzky, G. (2007). Nanopore in metal–dielectric sandwich for DNA position control. *Appl. Phys. Lett.*, 91, 153103.
  - [28] Branton, D., Deamer, D.W., Marziali, A., Bayley, H., Benner, S.A., Butler, T., Di Ventra, M., Garaj, S., Hibbs, A., Huang, X. et al. (2008). The potential and challenges of nanopore sequencing. *Nat. Biotechnol.*, 26, 1146–1153.
  - [29] Krems, M., Zwolak, M., Pershin, Y.V. and Di Ventra, M. (2009). Effect of noise on DNA sequencing via transverse electronic transport. *Biophys. J.*, 97, 1990–1996.