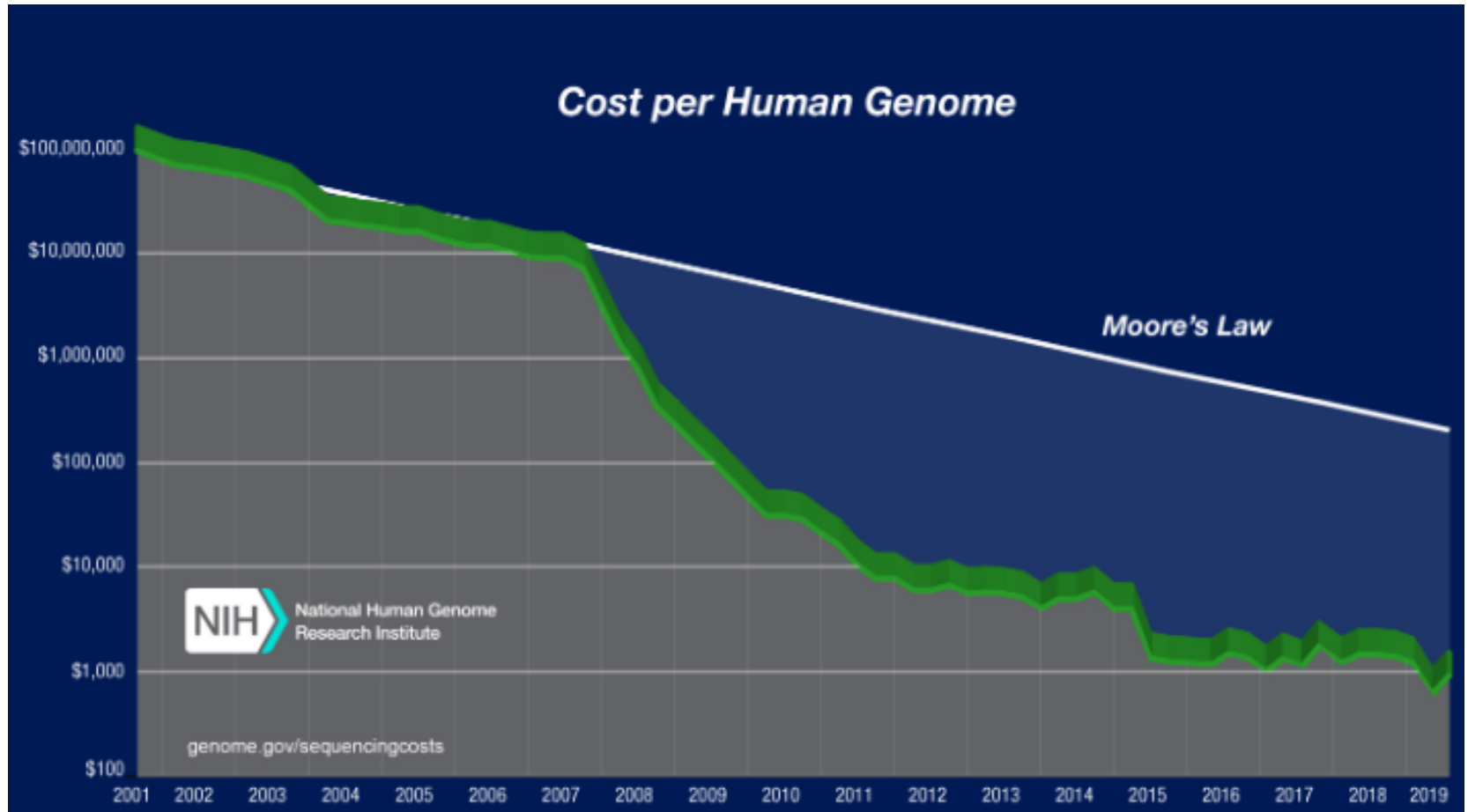


YENİ NESİL DİZİLEME

Company name

İnsan genom dizilemenin yıllara göre maliyet tablosu

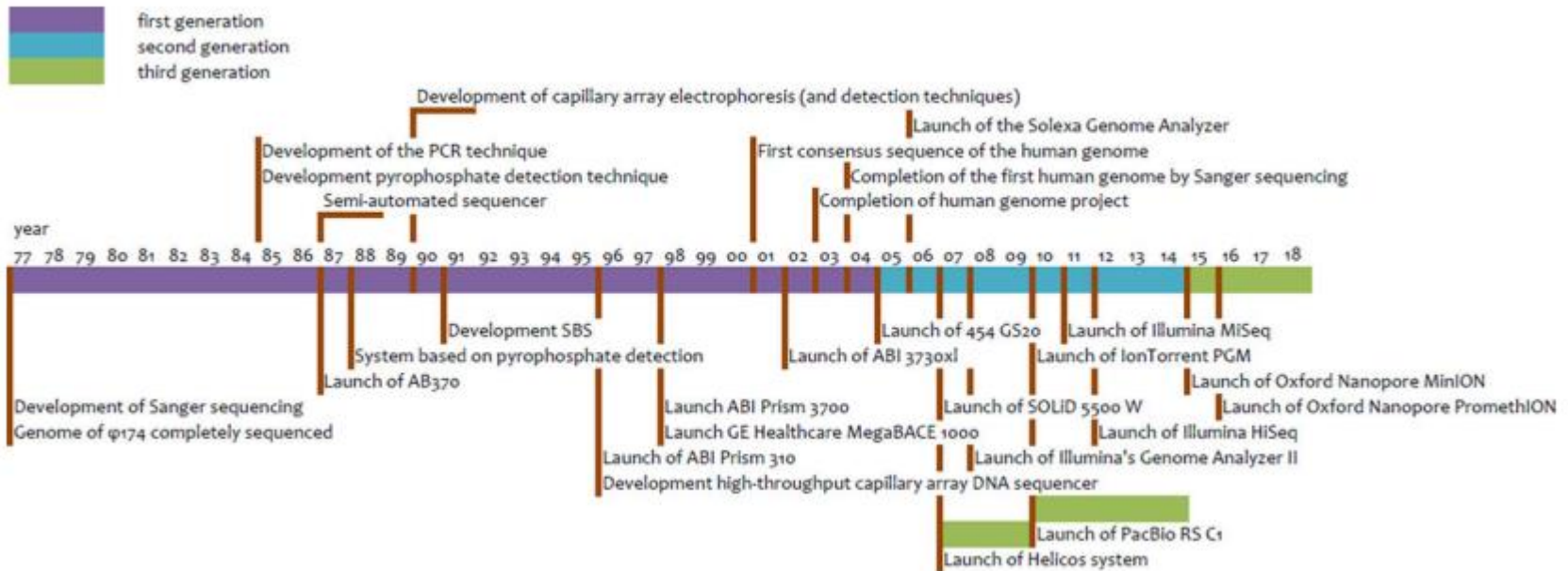


YENİ NESİL DİZİLEME



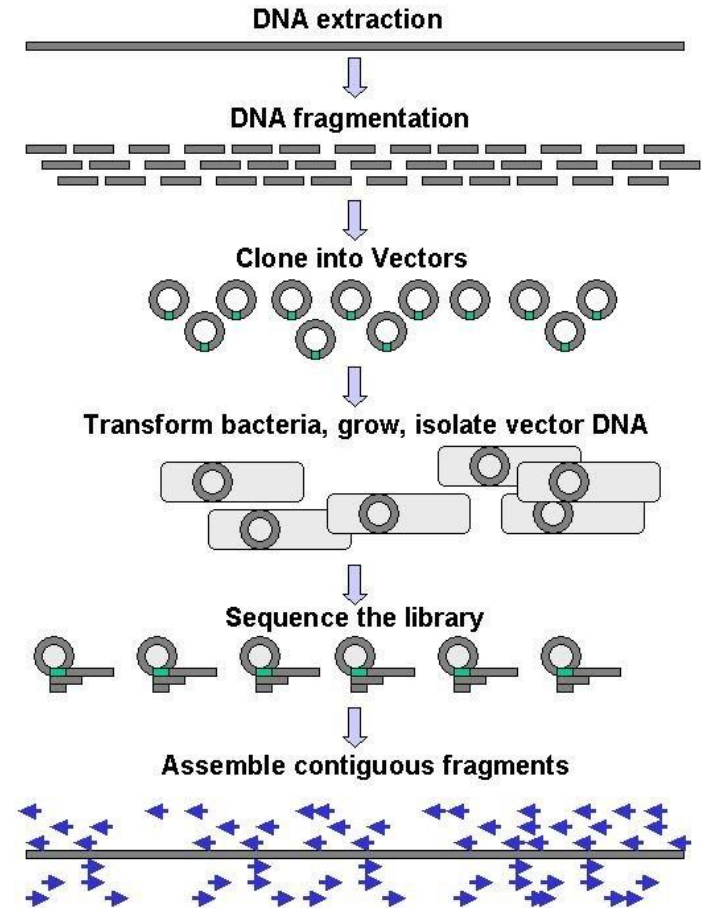
- İkinci nesil dizileme olarak tanımlanır.
- Toplu olarak paralel veya derin dizileme, genomik araştırmalarda devrim yaratan bir DNA dizileme teknolojisini tanımlayan ilgili terimlerdir.
- Prensi olarak Sanger dizileme gibi kapiller elektroforezi uygulanır.
- Genomik DNA parçalara ayrılır ve her bir parçadaki bazlar, parçalar kalıp DNA zincirine bağlandığında yayılan sinyallerle tanımlanır.
- **Sanger dizilemeden farkları:**
 - Aynı anda çok miktarda paralel
 - Mikroölçek; reaksiyonların çip üzerinde yapılması
 - Hızlı, (reaksiyonlar paralel yapıldığı için)
 - Düşük maliyetli; genom dizileme daha ucuza mal edilir
 - Daha kısa okuma parçaları, 50-700 bç

NGS-tarihçe



NGS

- Üç temel aşamada gerçekleştirilir:
 - **Kütüphane hazırlama:**
 - Kütüphane oluşturmak için DNA önce rastgele parçalara ayrılır, ardından özel bağlayıcılar (custom linker) ile bağlanır.
 - **Amplifikasyon (Çoğaltma):**
 - Kütüphane klonal amplifikasyon metotları ve PCR ile çoğaltılır.
 - **Dizileme:**
 - Farklı yöntemler uygulanır

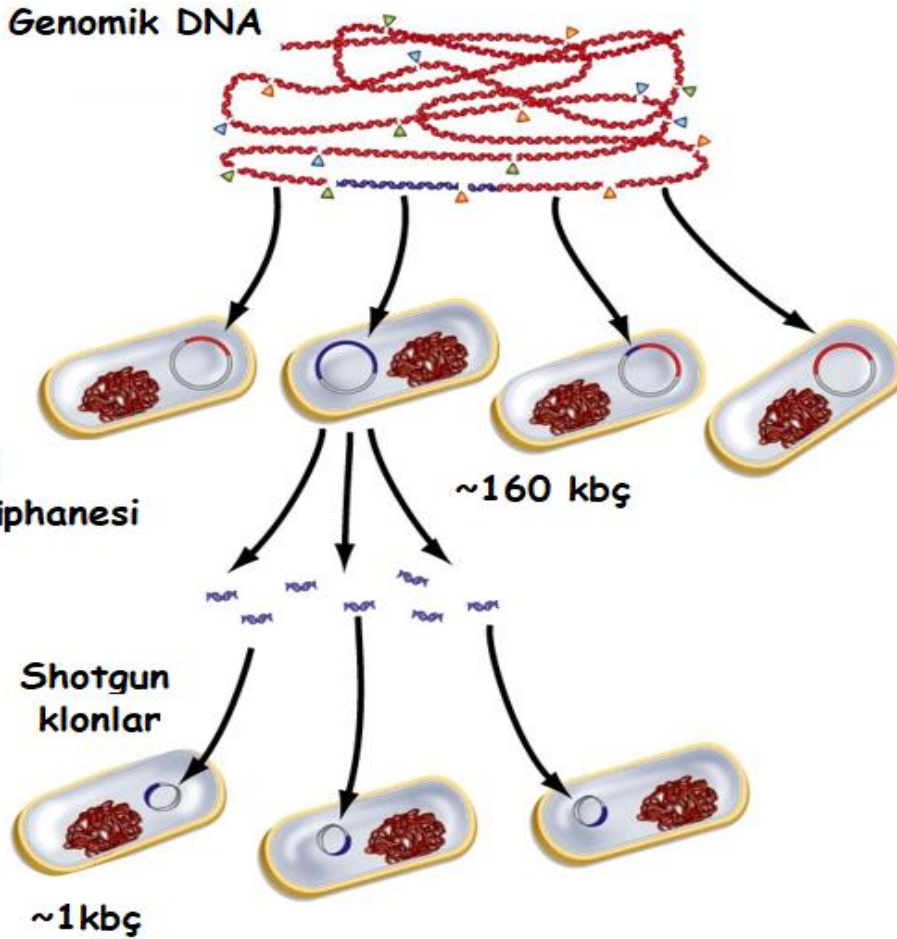


Shotgun dizileme



- Yüksek verimli dizilemede shotgun dizileme stratejisi kullanılmıştır.
- Genom, farklı restriksiyon endonükleazlarla, çok sayıda birbirini üzerine çakışan küçük parçalara ayrılır.
- Bu fragmentlerin her biri klonlanır ve sekansı çıkarılır.
- Daha sonra dizisi belirlenen her bir fragmentin birbirini üzerine çakışan noktaları bilgisayar tarafından tespit edilir.
- Sonuçta dizinin tamamını oluşturan doğrusal DNA ipliğinin sekansı ortaya çıkarılmış olur.

Shotgun dizileme



Çakışmalar
eşleştirilerek
sekans bir araya
getirilir



Shotgun dizisi

...ATTAGACTCGATAA
TAGACTCGATAAGGATGC...



BAC dizisi

...ATTAGACTCGATAAGGATGC...



Draft dizi

AAAAA **AAAAA** **AAAAA**

BAC örtüşmeleri genom dizisini verir

Shotgun dizi analizi

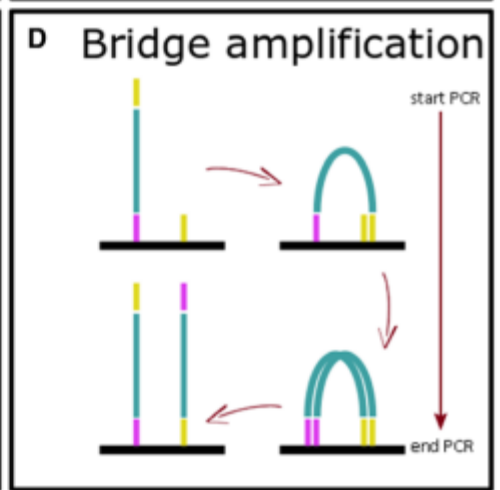
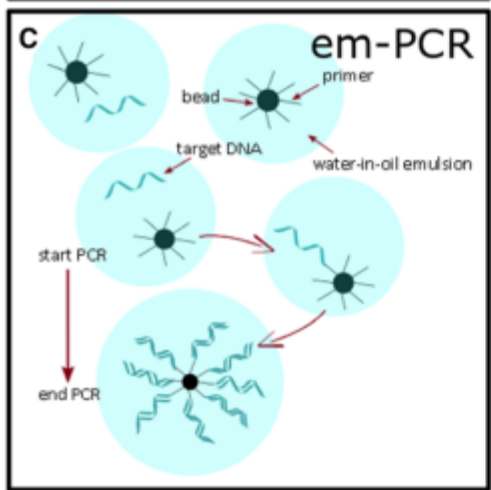
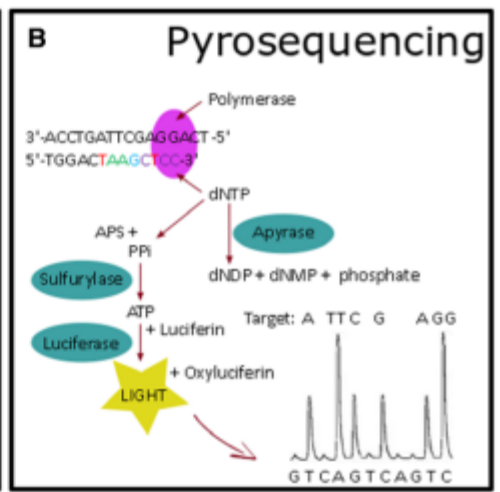
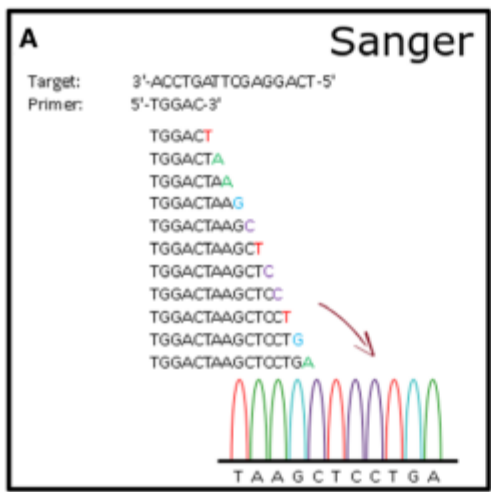


- Fragmentleri bir araya getirmek için çeşitli stratejiler tasarlanmıştır:
 - **Kromozom yürümesi (chromosome walking)**
 - **Restriksiyon enzim fingerprinting**
 - **Tekrarlı (repetitive) DNA fingerprinting**
 - **STS haritalama**
- Bu stratejilerin hepsinin temelinde, birbiri üzerine çakışan dizilere sahip fragmentlerin arka arkaya dizilmesi yatmaktadır.
- Dolayısıyla, “restriksiyon enzim fingerprinting”, en sık başvurulan ve pratikte uygulanabilirliği en yüksek olan stratejidir.

İkinci nesil genom dizileme teknolojileri



- Esas olarak iki şekilde gerçekleşir:
 - **Hibridizasyon ile dizileme**
 - SOLiD
 - **Sentezle dizileme**
 - 454/pirosekanslama
 - Illumina/Solexa



Hibridizasyon ile dizileme



- 1980 lerde orjinali geliştirilmiştir.
- Sekanslanması istenen DNA'nın etiketlenmiş parçalarına hibridize olmuş filtrelerdeki bilinen dizili DNA oligonükleotitlerinin kullanımıyla gerçekleştirilmiştir.
- Tekrar tekrar hibridizasyon, istenmeyen melezlenmemiş DNA nın yıkanması şeklindeki basamaklar sonrasında hibridize olmuş etiketli DNA parçalarının filtredeki DNA problemlerinin sekansı ile eşleşip eşleşmediğini belirlemek mümkündür.
- Böylece, prob hibridizasyon noktalarından üst üste binen bilgilere dayanarak daha büyük bitişik dizi bilgisi oluşturmak mümkün olmuştur.

Hibridizasyon ile dizileme: SOLiD dizileme/Applied Biosystems

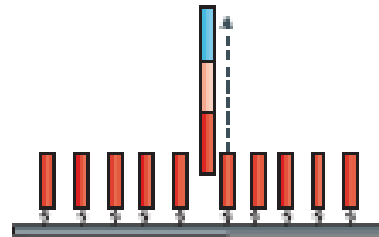


- SOLiD «Oligo Ligasyon Tespiti ile dizileme nin kısaltılmışıdır.
- Bu sistemin temeli, bir prod dizisinin bir DNA parçasına hibride olan bir florofora bağlanması ve görüntüleme için yakın bir nükleotide ligasyonla yapışmasıdır.
- 1 mikronluk küçük manyetik boncuklarla emPCR gerçekleştirilir.
- Bu teknikte, komplementer DNA zincirinde tüm olası varyasyonlarını içeren 8 bazlık oligonükleotidleri kullanır, bu oligoların 4. ve 5. bazları spesifik bir floresan işaretleyici ile etiketlenmiştir.
- Sonrasında, bağlanan oktamer 5. bazdan sonra kesilir, floresan işaret uzaklaştırılır ve bir sonraki ligasyon döngüsü başlar. İlk döngüde, 4-5, 9-10, 14-15 pozisyonlarındaki bazlar, ikinci döngüde; 3-4, 8-9, 13-14 vs. pozisyonundaki bazlar tespit edilmiş olur.

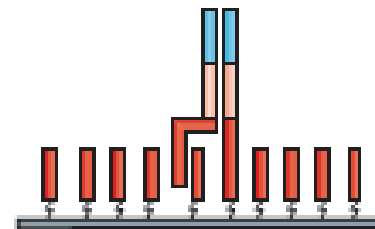
SOLID



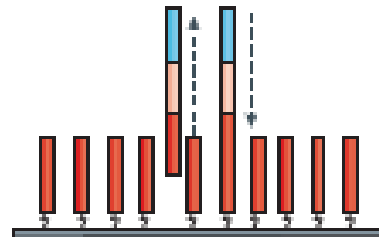
c Solid-phase template walking (SOLiD Wildfire (Thermo Fisher))



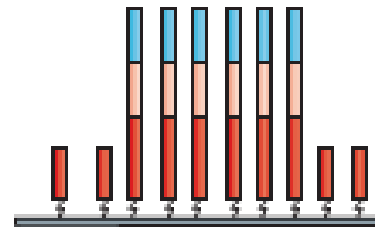
Template binding
Free DNA templates hybridize to bound primers and the second strand is amplified



Primer walking
dsDNA is partially denatured, allowing the free end to hybridize to a nearby primer

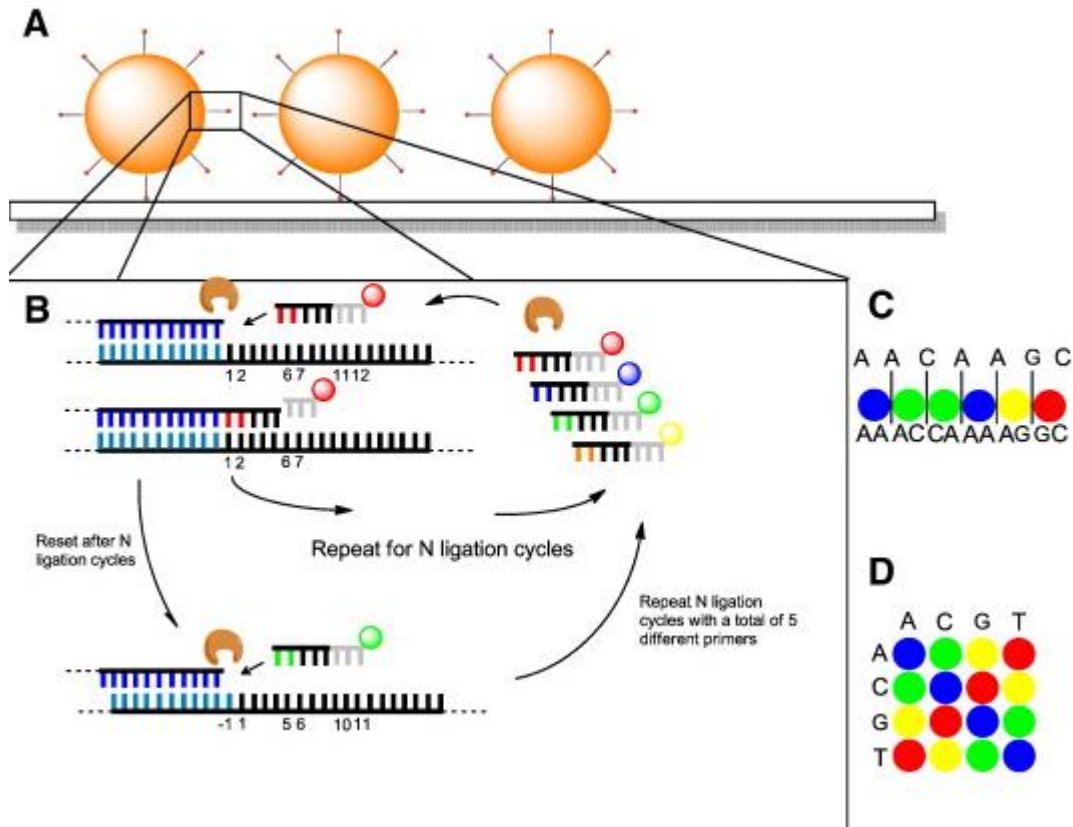


Template regeneration
Bound template is amplified to regenerate free DNA templates



Cluster generation
After several cycles of amplification, clusters on a patterned flow cell are generated

SOLiD: özet şema



Sentezle dizileme



- Çoğu SBS teknolojisi, sekanslanacak ayrı ayrı DNA moleküllerinin milyonlarca ayrı kuyuya veya odaya dağıtıldığı veya katı bir substrat üzerindeki belirli yerlere bağlandığı bir yöntem kullanır.
- PCR ile ya da «dönen halka» amplifikasyon metoduyla çoğaltılan DNA molekülleri DNA sentez reaksiyonlarına tabi tutulur.
- Sentez reaksiyonlarında etiketlenmiş nükleotidler ya da özel bir nükleotidin katılımına dayalı kimyasal reaksiyonlar görüntülenebilir veya başka şekilde tespit edilebilir.
- Sekanslama verimliliğe bağlı olarak birkaç saat ya da gün sürebilir.

Sentezle dizileme: 454-pirodizileme

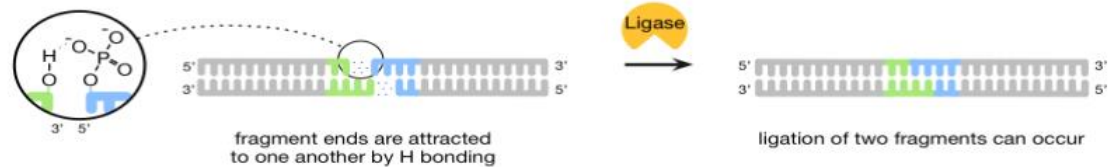
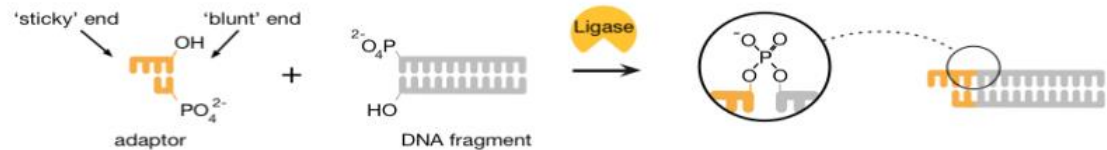
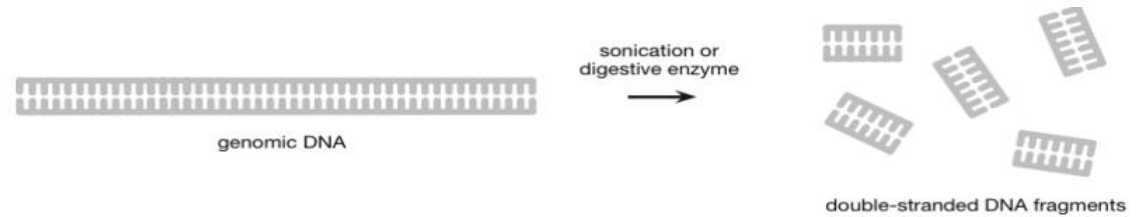


- Şuan kullanılmayan bir yöntem olup ikinci nesil NGS lerden ilk örneklerinden biridir.
- 400-700 bç uzunluğundaki her bir DNA parçası adaptörlere (boncuklar) bağlanır ve emülsiyon PCR reaksiyonu ile çoğaltılır.
- Boncuklardaki DNA dizileri adaptörlerdeki dizilere komplementerdir, bu ise DNA parçalarının doğrudan boncuklara, her boncukta ideal olarak bir DNA parçası bulunacak şekilde, bağlanmasına imkan verir.
- DNA sentezi ve ardından DNA sentez reaksiyonlarının kimyasal tespiti pirofosfat salınımının ölçüldüğü pikolitre ölçekli bir bölmede meydana gelir.
- Bu bölmelerin sırasıyla dört nükleotidden birini içeren reaksiyon ajanıyla ardarda yıkanması sonucunda doğru nükleotid sentezlenen zincire eklenir, ışık meydana getiren bir reaksiyon ile pirofosfat salınımı ölçülür.
- Işığın yoğunluğu aynı nükleotidin çok tekrarı olduğu durumlarda zorluk meydana getirir.

454-pirodizileme



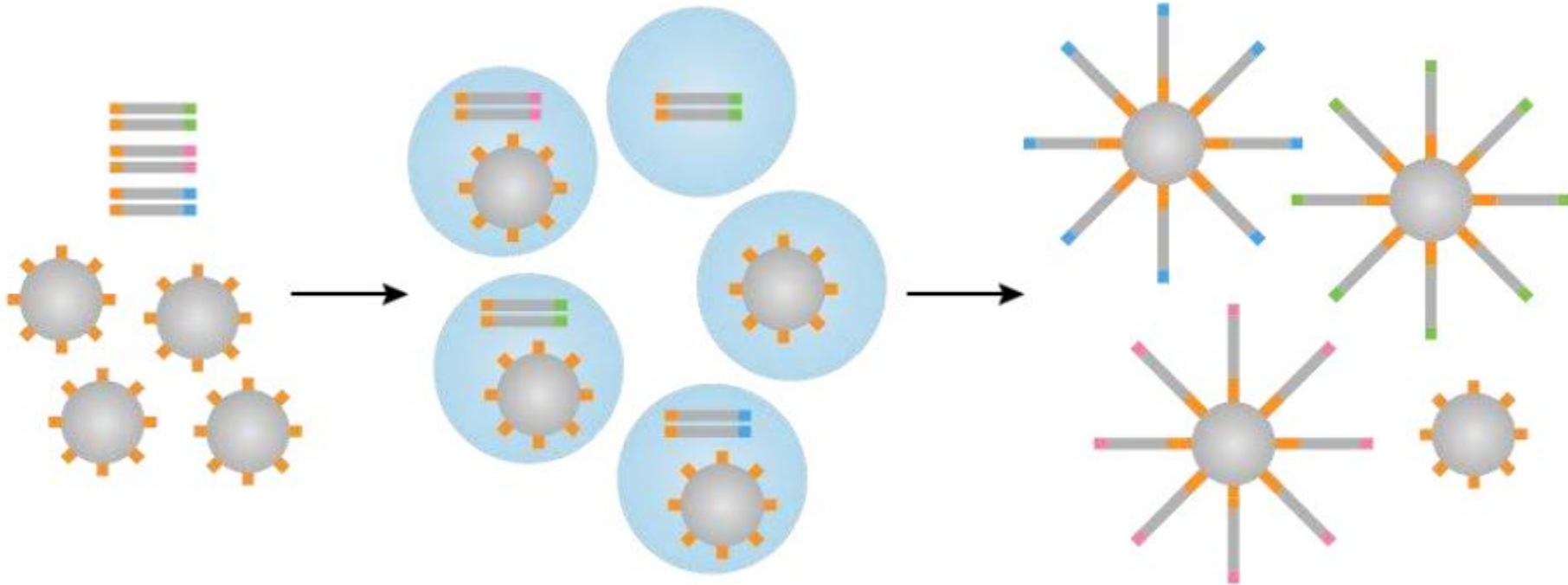
- DNA'nın parçalanması ve adaptörlerle bağlanması



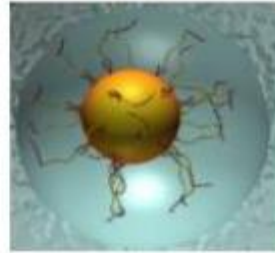
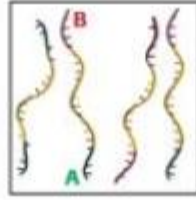
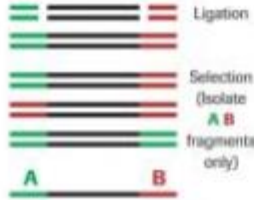
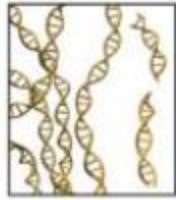
454-pirodizileme



- Emülsiyon PCR: emülsiyon yağı, boncuklar, PCR karışımı, kütüphane DNA karıştırılır ve bir emülsiyon oluşturulur.

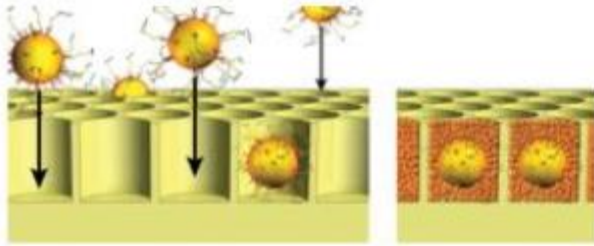


454/pirodizileme özet şema

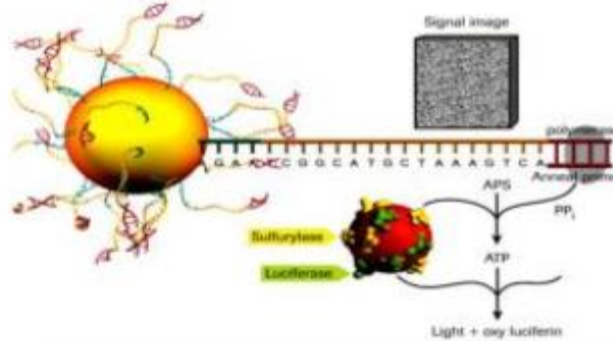


1. Adaptör bağı ssDNA hazırlığı (A-DNA-B)

2. EmPCR: Boncuklar üzerinde klonal amplifikasyon, zenginleştirme



3. Boncukların ve enzimleri PicoTiter plaklara yüklenmeleri



4. 454 Sekans cihazında sentez ile dizileme

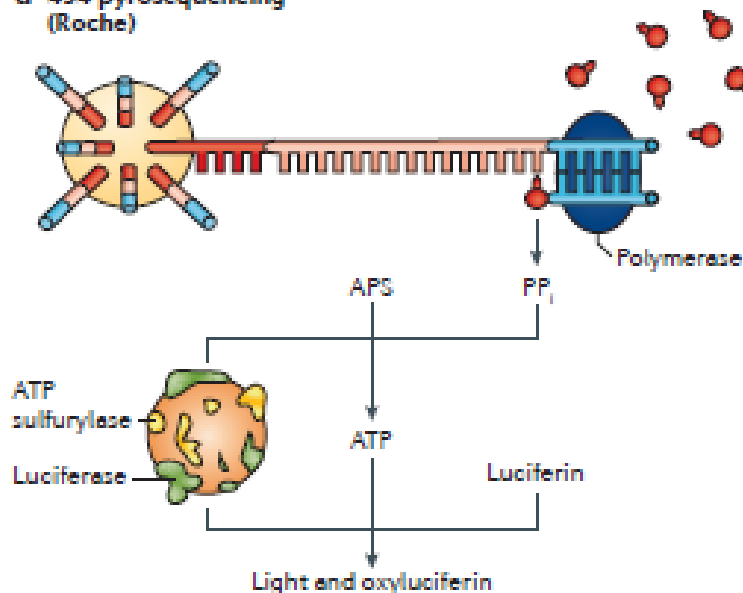


454 Roche Pyrosequencing

454/pirodizileme, sentezle dizileme



a 454 pyrosequencing (Roche)

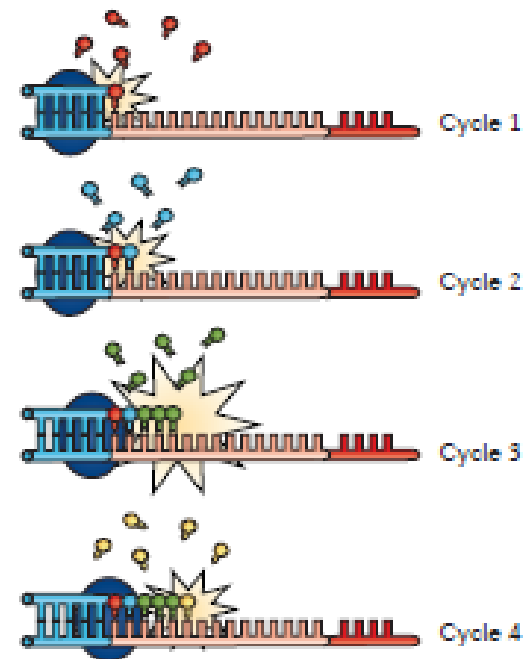


Pyrosequencing

As a base is incorporated, the release of an inorganic pyrophosphate triggers an enzyme cascade, resulting in light

Single nucleotide addition

Only one dNTP species is present during each cycle; multiple identical dNTPs can be incorporated during a cycle, increasing emitted light



Sentezle dizileme: ION TORRENT

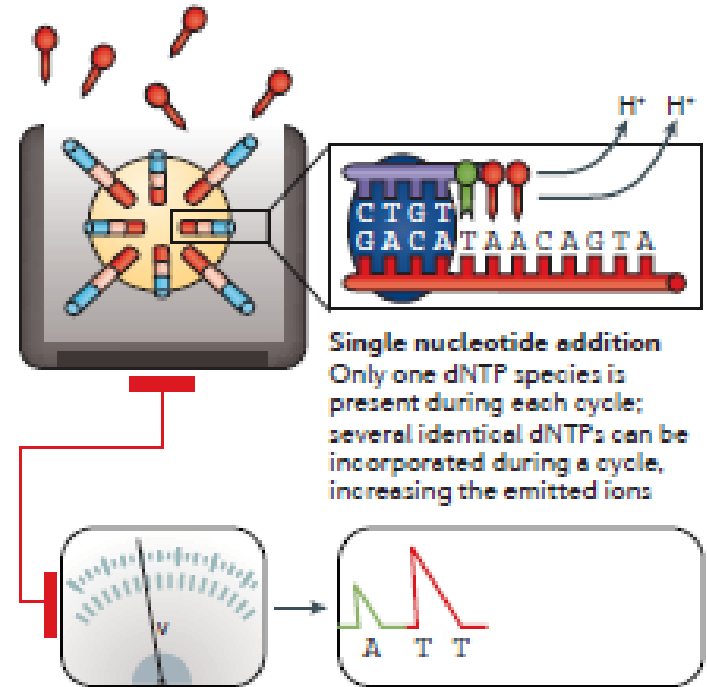
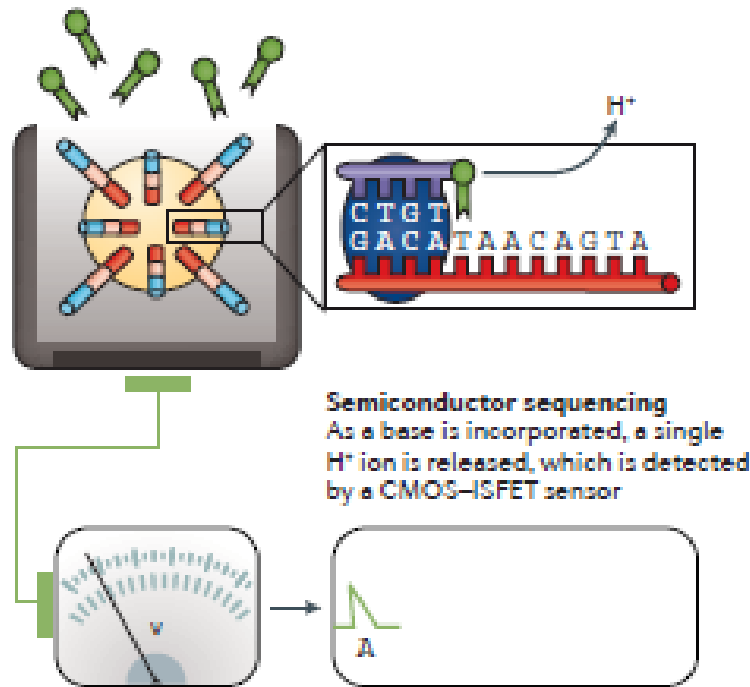


- Bu teknoloji nükleotid dizisini semi-kondüktör bir çipte dijital bir bilgiye dönüştürür. DNA sentezi reaksiyonunda, uzayan DNA zincirinde doğru nükleotid eklendiğinde bir H iyonu salınır.
- Bu değişim solüsyonun pH sınını değiştirir, iyon sensörü tarafından bir voltaj değişimi olarak kaydedilir.
- Eğer nükleotid eklenmezse voltaj değişimi olmaz.
- Bir seferde 4 nükleotitten sadece birini içeren sekanslama ajanları ile bir "sekanslama odasının-çemberinin" sırayla sulandırılması ve yıkanmasıyla, uygun nükleotit dahil edildiğinde voltaj değişiklikleri meydana gelir.
- İki yan yana nükleotid aynı nükleotid şeklinde zincire dahil olursa iki H salınır ve voltaj ikiye katlanır.
- Aynı nükleotitin büyük homopolimer dizilerininin fark edilmesi bazen zordur.

ION TORRENT, sentezle dizileme



b Ion Torrent
(Thermo Fisher)



Sentezle dizileme: Illumina



- İkinci nesil sekanslama alanındaki en önemli oyuncu, ilk olarak Solexa ve Lynx Therapeutics tarafından geliştirilen teknolojiyi kullanan Illumina'dır.
- Illumina dizilimi, "köprü amplifikasyonu" olarak bilinen bir tekniğe dayanmaktadır, burada her bir uca ligatlanmış uygun adaptörlere sahip DNA molekülleri (yaklaşık 500 bp), tamamlayıcı oligonükleotid dizileri içeren katı bir destek (cam slayt) üzerinde tekrarlanan amplifikasyon sentezi reaksiyonları için substratlar olarak kullanılır.
- Slayt üzerindeki oligonükleotidler, daha sonra tekrarlanan amplifikasyon turlarına tabi tutulan DNA'nın, her bir oligonükleotid fragmanının yaklaşık 1000 kopyasından oluşan klonal "kümeler" oluşturacağı şekilde aralıklıdır.
- Her cam slayt milyonlarca paralel küme reaksiyonunu destekleyebilir. Sentez reaksiyonları sırasında, her biri farklı bir floresan etiketine sahip dört bazın her birine karşılık gelen tescilli modifiye edilmiş nükleotitler dahil edilir ve daha sonra tespit edilir.
- Nükleotidler ayrıca her reaksiyon için bir sonraki sentez turu tespit edildikten sonra engellenmeyen sentez sonlandırıcıları olarak işlev görür. Reaksiyonlar 300 veya daha fazla tur boyunca tekrarlanır.
- Floresan algılama kullanımı, kamera tabanlı görüntülemenin aksine, doğrudan görüntüleme nedeniyle algılama hızını artırır.

Sentezle dizileme: illumina



- Farklı Illumina dizileme cihazları, MiniSeq, MiSeq, NextSeq, NovaSeq ve HiSeq modelleri de dahil olmak üzere çeşitli seviyelerde verim sağlar. MiniSeq, 2X150bp okumalarda bir run da (çalıştırmada) 25 milyon okuma ile 7,5 Gb veri sağlar. MiSeq, 15 Gb'lik çıktı için 2X 300 bp okuma ile 25 milyon okuma yapabilir. NextSeq, 2 X150 bp okuma uzunluğunda 400 milyon okumayla 120 Gb veri sağlayabilir.
- Illumina dizilemede bir kümenin bireysel örnekleri arasında dizileme reaksiyonlarındaki senkronizasyon sorunu söz konusu olabilir.

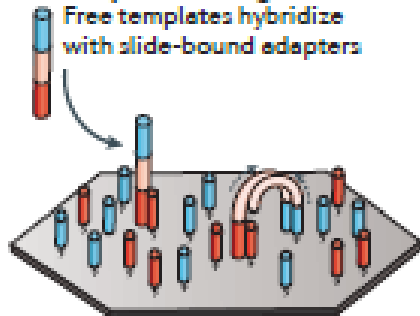
illumina –BRIDGE PCR, sentezle dizileme



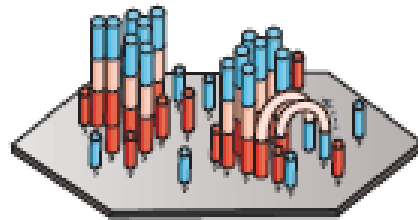
b Solid-phase bridge amplification (Illumina)

Template binding

Free templates hybridize with slide-bound adapters

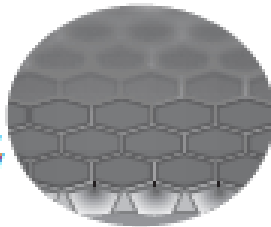


Bridge amplification
Distal ends of hybridized templates interact with nearby primers where amplification can take place

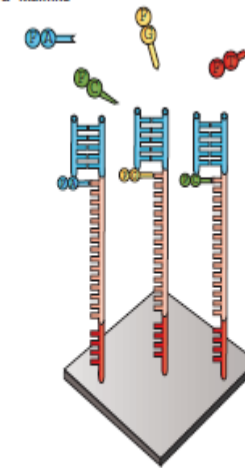


Cluster generation
After several rounds of amplification, 100–200 million clonal clusters are formed

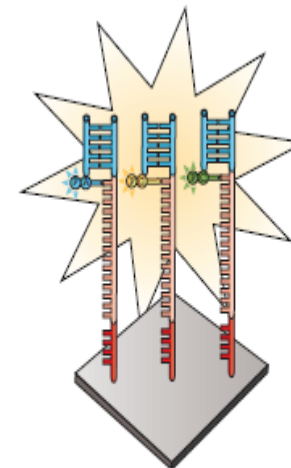
Patterned flow cell
Microwells on flow cell direct cluster generation, increasing cluster density



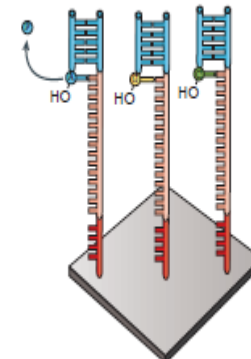
a Illumina



Nucleotide addition
Fluorophore-labelled, terminally blocked nucleotides hybridize to complementary base. Each cluster on a slide can incorporate a different base.



Imaging
Slides are imaged with either two or four laser channels. Each cluster emits a colour corresponding to the base incorporated during this cycle.



Cleavage
Fluorophores are cleaved and washed from flow cells and the 3'-OH group is regenerated. A new cycle begins with the addition of new nucleotides.

Üçüncü Nesil Dizileme



- PacBio
- Heliscope
- İkinci nesil dizileme yöntemlerinin aksine, üçüncü nesil dizileme yöntemleri uzun DNA (ve RNA) moleküllerini sekanslamayı amaçlamaktadır.

Üçüncü Nesil dizileme- PacBio



- Bu alandaki mevcut ticari teknoloji lideri, iki sıralı sistem, orijinal RSII modeli ve son zamanlarda Sequel TM 'i ticarileştiren Pacific Biosciences (PacBio)' dur.
- SMRT (Single Molecule Real Time) sekansı olarak da adlandırılan PacBio sekanslama, çok uzun fragmanların 30–50 kb veya daha uzun bir sekansta sekanslanmasını sağlar. SMRT yöntemi, dizilenecek DNA nın bir DNA polimeraz ile bir SMRT akış hücreesindeki bir kuyunun (sıfır modlu dalga kılavuzu (ZMW)) altına bağlanmasını içerir. Bir ZMW, ışık enerjisini, aydınlatıcı ışığın dalga boyuna göre boyutları küçük bir alana yönlendiren küçük bir bölmedir.

Üçüncü Nesil dizileme- PacBio



- ZMW tasarımı ve kullanılan ışığın dalga boyu nedeniyle, görüntüleme sadece ZMW'nin dibinde gerçekleşir, burada DNA'ya bağlı DNA polimeraz her bazı uzayan zincire ekler.
- Dört nükleotid, diferansiyel algılama için farklı fosfo-bağlı floroforlarla etiketlenmiştir.
- Büyüyen zincire bir nükleotid dahil edildiğinde, görüntüleme milisaniye zaman ölçeğinde gerçekleşir.
- Eklemekten sonra, fosfat bağlı floresan eklenti salınır, ZMW'nin tabanından “uzaklaşır” ve artık tespit edilemez.
- Ardından, bir sonraki nükleotit eklenir.
- Görüntüleme, nükleotid katılım oranı ile zamanlanır, böylece her baz, büyüyen DNA zincirine dahil edildiğinde tanımlanır.
- Bu işlemler eşzamanlı olarak SMRT hücreleri içinde tek bir yonga üzerinde bulunan bir milyon zeptolitre ZMW'de paralel olarak gerçekleşir.

Üçüncü Nesil dizileme- PacBio

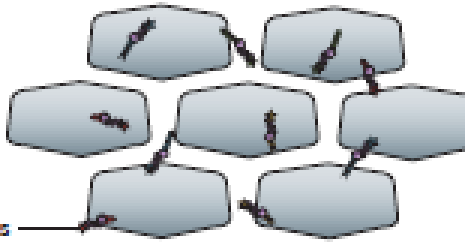


Pacific Biosciences

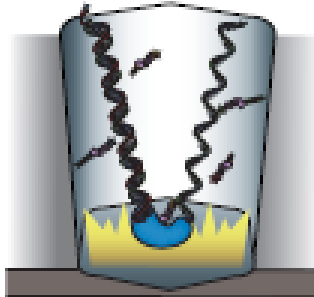
SMRTbell template
Two hairpin adapters
allow continuous
circular sequencing



ZMW wells
Sites where
sequencing
takes place



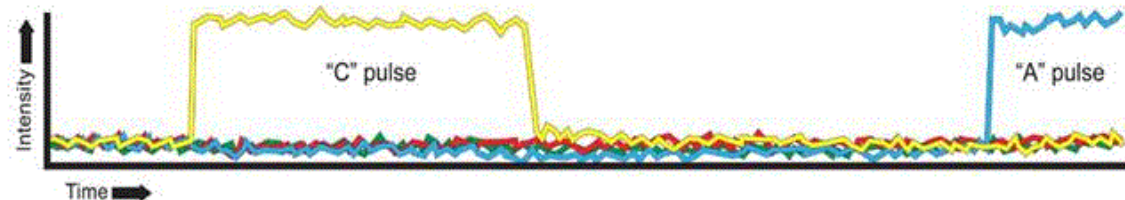
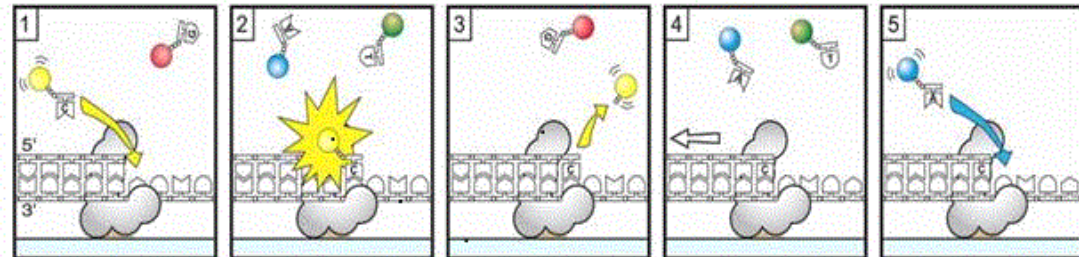
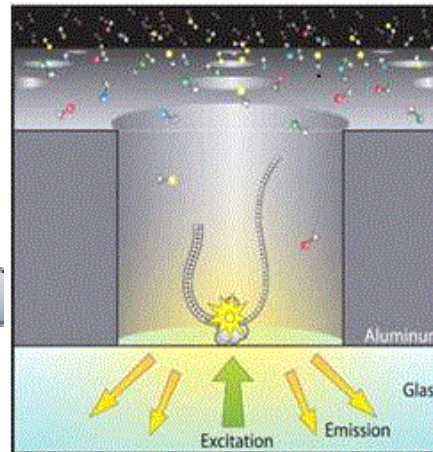
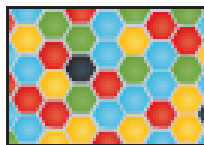
Labelled nucleotides
All four dNTPs are
labelled and available
for incorporation



Modified polymerase
As a nucleotide is
incorporated by the
polymerase, a camera
records the emitted light

PacBio output

A camera records the changing
colours from all ZMWs; each
colour change corresponds to
one base



Üçüncü Nesil dizileme- Heliscope



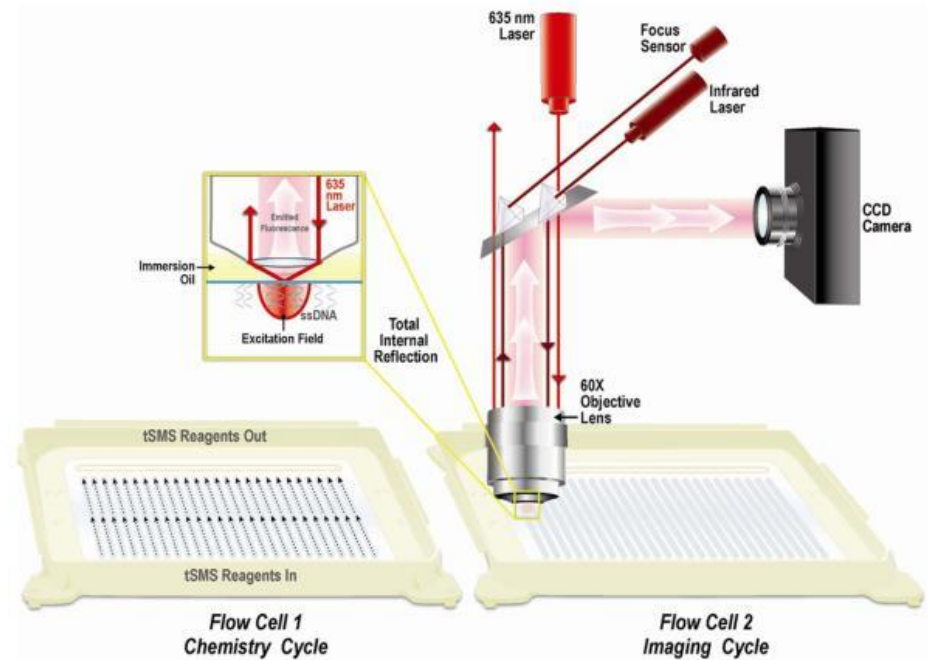
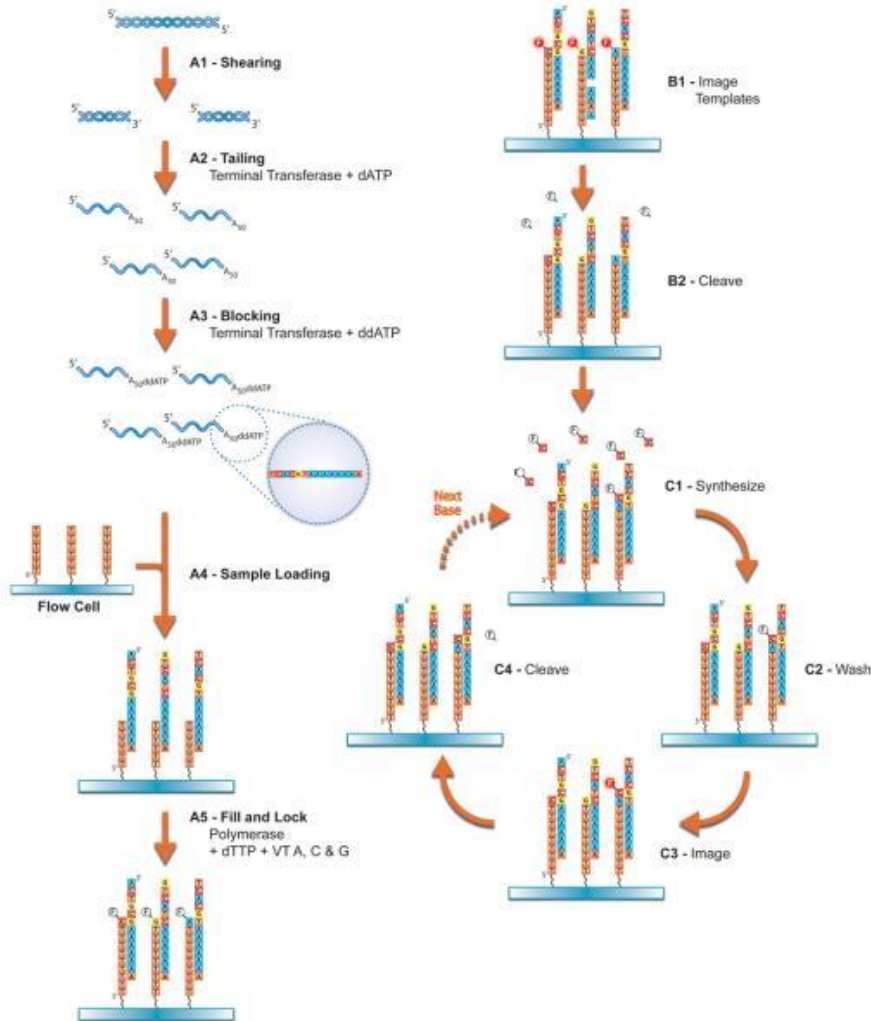
- Helicos TM Tek Molekül Sekanslama (SMS), hücresel nükleik asitlerin doğrudan sekanslanması yoluyla, hem doğru kantitasyon hem de sekans bilgileri sağlayarak, genom biyolojisinin eşsiz bir görünümünü sağlar.
- Numune hazırlama, ligasyon veya PCR amplifikasyonu gerektirmez, diğer teknolojilerde gözlemlenen GC içeriğinden ve boyut sapmasından kaçınır.
- DNA basitçe kesilir, poli A ile kuyruklanır ve milyarlarca molekülün paralel olarak sentezlenmesi için oligo-dT içeren bir akış hücresi yüzeyine hibritlenir.

Üçüncü Nesil dizileme- Heliscope



- Sekanslama için hedeflenen DNA molekülleri, tek kullanımlık cam akış hücreleri üzerinde yerinde hibridize edilir.
- Numuneler, sıcaklığın optimal hibridizasyon için ayarlanabildiği Helicos Sample Loader kullanılarak akış hücrelerine yüklenir.
- Akış hücreleri (25 kanallı) uygun şekilde yerleştirildikten sonra, sentez ve görüntüleme yoluyla sekanslama için gerekli tüm reaktiflerle birlikte HeliScope™ Sekanslama Sistemine yerleştirilir.
- Sekanslama Sisteminde, görüntüler Helicsope™ Analiz Motoru tarafından gerçek zamanlı olarak işlenmesiyle gerektiği kadar sekanslanma sağlanır.
- Analiz Motoru her fiziksel konumdan görüntüleri işler ve bu görüntülerden dizi okumaları oluşturur.
- İşlem tamamlandığında, görüntüler işlenir ve zincir oluşumu tamamlanır; gerektiğinde referans hizalama veya montaj için kullanılmak üzere veriler indirilir.

Üçüncü Nesil dizileme- Heliscope



Dördüncü Nesil Dizileme- Oxford Nanopore



- 4G platformları, 3G'nin tek molekül dizilimini ve nanopore teknolojisini entegre ederek hızlı bir şekilde gelişmiştir. Nanopor teknikleri, amplifikasyon gerektirmeden sekanslama, tekrarlanan döngüler olmadan gerçek zamanlı sekanslama ve sentezin ortadan kaldırılmasıyla elde edilir ve bu nedenle 4G sekanslama teknikleri olarak sınıflandırılır.
- Uzun DNA moleküllerini küçük çaplı “deliklerden” geçirmek ve her bir nükleotit bağlı bir dedektörden geçerken farklı akımları ölçmek mümkündür. Teorik olarak, nanopore içinden yüzlerce kb'den fazla DNA geçirilebilir ve birçok kanalda, nispeten düşük maliyetle onlarca ila yüzlerce Gb dizisi elde edilebilir.

Dördüncü Nesil Dizileme- Oxford Nanopore



- DNA dizilemesi için iki tip nanopore sistemi geliştirilmektedir; biyolojik membran sistemleri ve katı hal sensör teknolojisi.
 - **Biyolojik nanopore sekanslama, gözenekleri üretmek için bir lipit membrana gömülmüş transmembran proteinlerinin kullanımına dayanır.**
 - **Katı hal sensör teknolojisi, DNA veya RNA'nın geçmesine izin veren nanometre boyutlu gözeneklere sahip çeşitli metal veya metal alaşımlı substratlar kullanır.**

Dördüncü Nesil Dizileme- Oxford Nanopore



- Oxford Nanopore Teknolojileri (i.e. PromethION) her bir nükleotit detektörden geçerken karakteristik akım değişikliklerinin meydana geldiği elektriksel olarak dirençli bir polimer zarında protein nanoporları kullanır.
- Uzun dsDNA molekülleri ilk olarak phi29 polimeraz gibi işlemsel bir enzime bağlanır.
- Kompleks bir nanopore ile karşılaştığında, bir DNA ipliği nanopora girer ve gözenek içinden translokasyon hızı DNA polimeraz sentezi ve translokasyonu ile düzenlenir.
- İşlemci enzim, DNA'nın içinden sürekli ve işlemsel olarak “perçinlenmesini” sağlar.
- Bir nükleotit gözenekten geçerken, nanopore uygulanan bir akımı bozar.
- Her nükleotit, bir akım kesintisi olayı olarak kaydedilen karakteristik bir elektronik sinyal sağlar.
- Kayıt gerçek zamanlıdır ve 10kb okumalar artık makul bir çıktı olsa da, teorik olarak 100 kb DNA her nanopore içinden geçebilir ve tespit edilebilir.
- DNA bir nanopordan ayrıldıktan sonra, gözenek farklı bir DNA molekülü tarafından kullanılabilir.

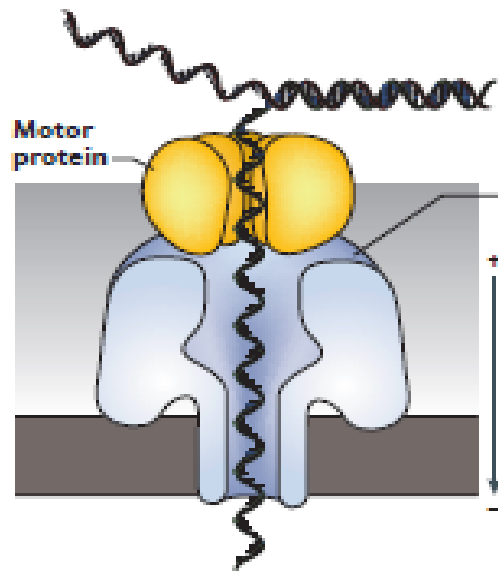
Dördüncü Nesil Dizileme- Oxford Nanopore



Oxford Nanopore Technologies

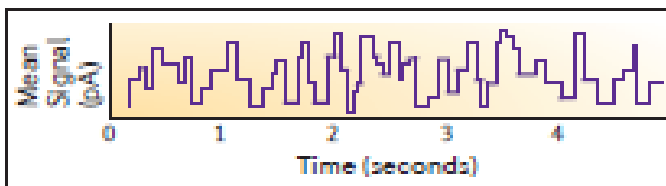


Leader-Hairpin template
The leader sequence interacts with the pore and a motor protein to direct DNA, a hairpin allows for bidirectional sequencing



Alpha-hemolysin
A large biological pore capable of sensing DNA

Current
Passes through the pore and is modulated as DNA passes through



ONT output (squiggles)
Each current shift as DNA translocates through the pore corresponds to a particular k-mer

Yüksek verimli dizileme yöntemlerinin karşılaştırılması



Method	Advantages	Disadvantages	Comments
Second-generation sequencing techniques			
454 sequencing	Generates long read lengths and relatively fast run times of the instrument	Poor interpretation of homopolymers leading to errors	First introduced NGS technique
Illumina (Solexa) Genome Analyzer	Short read length approach and is the most widely used analyzer	Aberrant incorporation of incorrect dNTPs by polymerases	Low multiplexing ability
HiSeq 2000 (Illumina, CA, USA)	Requires less sample < 1 µg	75 (35-100) bp read lengths. More false positives	Addition of fluorescent-labeled nucleotides
ABI SOLiD system	Reduction in error rates relative to Illumina NGS system	Have long run times and need for 2-20 µg DNA	Driven by DNA ligase than polymerase
Polonator G. 007	Decode the base by single-base probe in nonamers	In adequate coverage, false-positive SNP selection rate	Ligation based sequencer

Ion Torrent Sequencing	First platform to eliminate cost and complexity with 4-color optical detection used by other NGS platforms	High accuracy and short run time	Non-optical DNA sequencing
SLAF-seq	De novo SNP discovery with reduced cost and high accuracy	Needs complex instrument	Double barcode system ensures simultaneous genotyping of large populations
Third-generation sequencing techniques			
PacBio RS (Pacific Biosciences, CA, USA)	No amplification of template DNA required, real-time monitoring of nucleotide incorporation,	High error rates and low reads	Generates long-read lengths 800-1000 bp
Heliscope™ Sequencer	Nonbiased DNA sequence	High NTP incorporation error rates	Single molecule sequencing
Fourth-generation techniques			
Oxford Nanopore	Fastest sequencer whole-genome scan within 15 min	Not much data available, high cost per Mb	Expanding technique

Çeşitli DNA dizileme tekniklerinin özeti

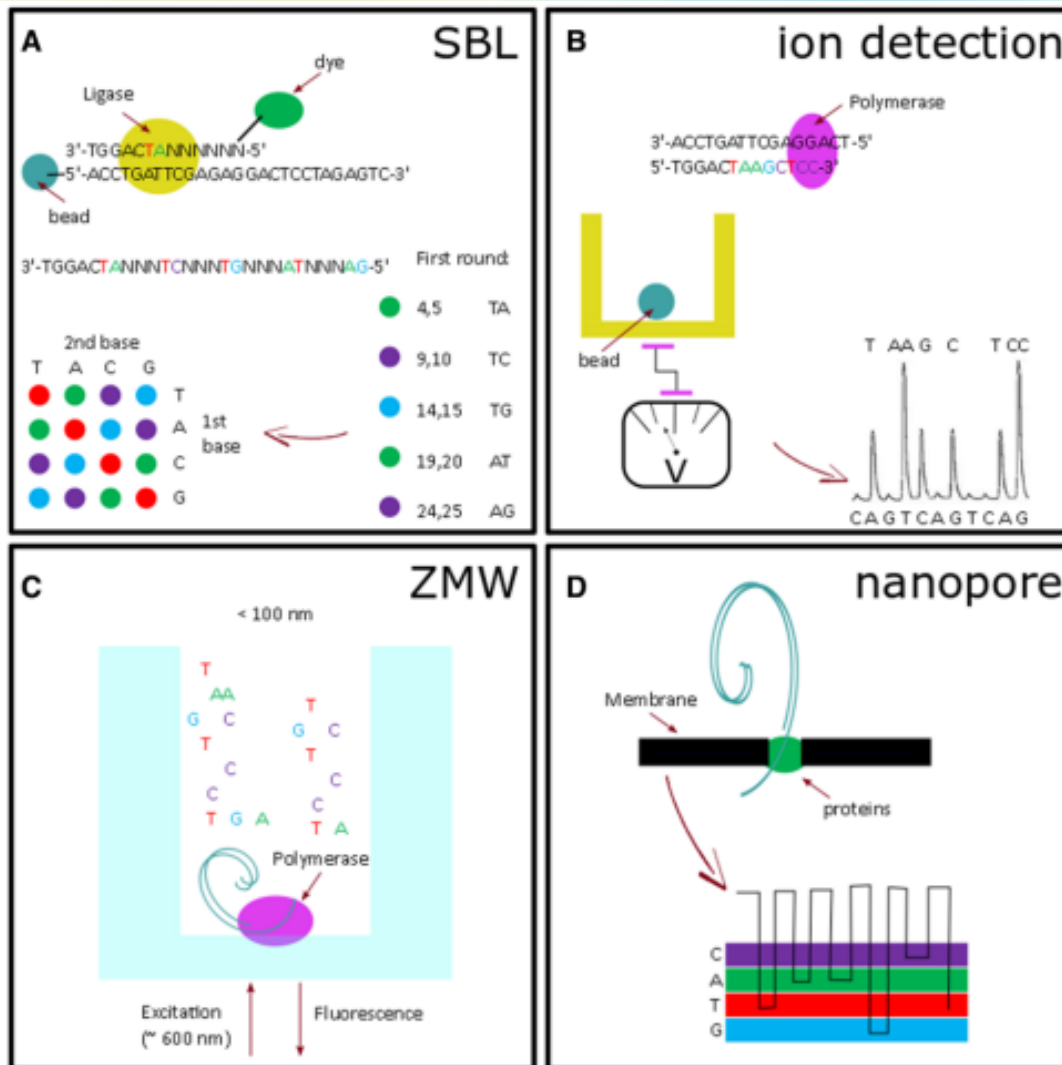


Figure 3. Overview of several DNA sequencing techniques with the principle of (A) sequencing by ligation (SBL, e.g. SOLiD[®]), (B) ion detection (e.g. Ion Torrent[™]), (C) zero-mode waveguides (ZMWs, e.g. PacBio[®]) and (D) nanopores (e.g. Oxford Nanopore).

Kaynakça

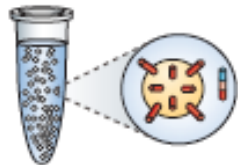


- Seda ÖRENAY BOYACIOĞLU, Munis DÜNDAR (2012). GEN HARİTALAMA STRATEJİLERİ Gene Mapping Strategies. Sağlık Bilimleri Dergisi (Journal of Health Sciences) 21(1) 50-60, 2012
- TA BROWN, Genomlar 3
- Prof. Dr. Bektaş TEPE, Genomik ve ötesi. <http://www.bektastepe.net/course-slides/5-genomik-ve-otesi.pdf>
- <https://jvanderw.une.edu.au/lect09.pdf>
- <https://www.khanacademy.org/science/high-school-biology/hs-molecular-genetics/hs-biotechnology/a/dna-sequencing>
- [https://tr.wikipedia.org/wiki/DNA_dizileme#Maxam - Gilbert dizilemesi](https://tr.wikipedia.org/wiki/DNA_dizileme#Maxam_-_Gilbert_dizilemesi)
- <https://www.khanacademy.org/science/high-school-biology/hs-molecular-genetics/hs-biotechnology/a/dna-sequencing>
- Brigitte Bruijns, Roald Tiggelaar, Han Gardeniers. 2018. Massively parallel sequencing techniques for forensics: A review. Electrophoresis 2018, 0, 1–13 1
- Barton E. Slatko, Andrew F. Gardner, and Frederick M. Ausubel. 2018. Overview of Next Generation Sequencing Technologies. Curr Protoc Mol Biol. 2018 April ; 122(1): e59. doi:10.1002/cpmb.59
- **Srilakshmi Srinivasan and Jyotsna Batra.** Four Generations of Sequencing- Is it ready for the Clinic Yet? **Journal of Next Generation Sequencing & Applications.** DOI: 10.4172/2469-9853.1000107
- Sara Goodwin, John D. McPherson and W. Richard McCombie. Coming of age: ten years of next-generation sequencing Technologies. NATURE REVIEWS, VOLUME 17 | JUNE 2016 |
- Thompson, J. F., & Steinmann, K. E. (2010). Single molecule sequencing with a HeliScope genetic analysis system. *Current protocols in molecular biology, Chapter 7, Unit7.10.* <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0710s92>

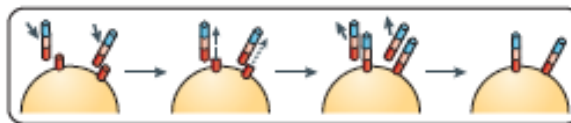
Amplifikasyon çeşitleri



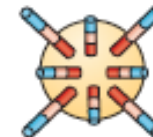
a Emulsion PCR (454 (Roche), SOLiD (Thermo Fisher), GeneReader (Qiagen), Ion Torrent (Thermo Fisher))



Emulsion
Micelle droplets are loaded with primer, template, dNTPs and polymerase

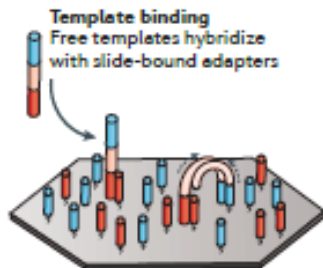


On-bead amplification
Templates hybridize to bead-bound primers and are amplified; after amplification, the complement strand disassociates, leaving bead-bound ssDNA templates

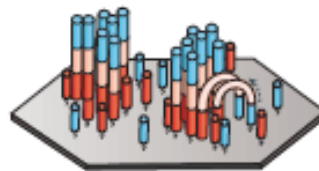


Final product
100–200 million beads with thousands of bound template

b Solid-phase bridge amplification (Illumina)

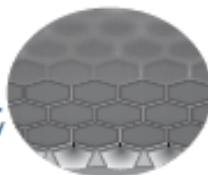


Bridge amplification
Distal ends of hybridized templates interact with nearby primers where amplification can take place

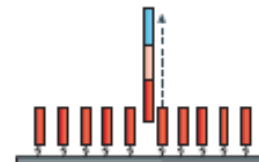


Cluster generation
After several rounds of amplification, 100–200 million clonal clusters are formed

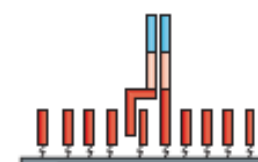
Patterned flow cell
Microwells on flow cell direct cluster generation, increasing cluster density



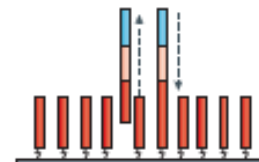
c Solid-phase template walking (SOLiD Wildfire (Thermo Fisher))



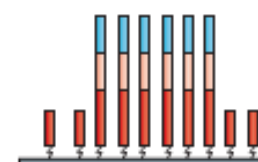
Template binding
Free DNA templates hybridize to bound primers and the second strand is amplified



Primer walking
dsDNA is partially denatured, allowing the free end to hybridize to a nearby primer



Template regeneration
Bound template is amplified to regenerate free DNA templates



Cluster generation
After several cycles of amplification, clusters on a patterned flow cell are generated