

Odysea čítania DNA

**RNDr. Radka Tomášová¹, Mgr. Gabriela Pavlíková, PhD.¹, RNDr. Miroslav Tomka, PhD.¹,
RNDr. Ivana Hojsíková²**

¹MEDIREX GROUP ACADEMY, n. o., člen MEDIREX GROUP

²Medirex, a. s., člen MEDIREX GROUP, Bratislava

Sekvenovanie DNA je proces určenia presného poradia nukleotidov v molekule DNA. Zahŕňa rôzne metódy a technológie, ktoré determinujú poradie štyroch báz – adenín (A), guanín (G), cytozín (C) a tymín (T) v reťazci DNA. V 21. storočí vzniká sekvenovanie novej generácie (NGS), ktoré v mnohých ohľadoch prekonáva klasické metódy sekvenovania. Nové technológie vynikajú vysokým výkonom, rýchlosťou a nízkymi nákladmi v prepočte na jednu bázu. V súčasnosti je NGS najrýchlejšie sa rozvíjajúcou metódou molekulovej genetiky, ktorá v blízkej budúcnosti môže priniesť zlom v personalizovanej medicíne. V tomto prehľade stručne popisujeme základné princípy a hlavné typy NGS technológií.

Kľúčové slová: sekvenovanie DNA, sekvenovanie novej generácie, masívne paralelné sekvenovanie, aplikácie NGS.

The DNA reading odyssey

DNA sequencing is the process of determination of the precise order of nucleotides within a DNA molecule. It includes all methods or technologies that are used to determine the order of the four bases - adenine (A), guanine (G), cytosine (C) and thymine (T) in a strand of DNA. In the 21st century, the new technology - a next generation sequencing (NGS) was developed, which in many respects exceeds the conventional sequencing methods. New technologies are specified by high performance, speed and low cost per base. Currently the NGS is one of the most rapidly advancing method in molecular genetics and has the potential to significantly influence the field of personalized medicine in the near future. In this review, we briefly describe basic principles of the mostly used NGS technologies.

Key words: DNA sequencing, next generation sequencing, massively parallel sequencing, NGS applications.

NewsLab, 2015; roč. 2(1): 7–10

Klasické metódy sekvenovania

Prvé pokusy sekvenovania biomakromolekul sa datujú do 70. rokov minulého storočia, keď boli realizované nepriamo – sekvenovaním molekúl RNA alebo proteínov. Prvú sekvenciu DNA získal v roku 1968 Ray Wu z Cornellovej univerzity. Bol to reťazec z okrajovej oblasti genómu fága λ (Lambda) dlhý 12 nukleotidov. V roku 1977 dva pracovné tímy nezávisle od seba predstavili dva odlišné prístupy sekvenovania, čo znamenalo prelom vtedajších techník. Boli to: chemická Maxam-Gilbertova metóda a enzymatická metóda popísaná Frederickom Sangerom.

Maxam-Gilbertova metóda funguje na princípe kaskády chemických reakcií štiepiacich špecificky nukleotidové bázy v jednovláknových DNA molekulách, ktoré sú na svojich koncoch značené. Naštiepené a následne sú rozdelené podľa svojej veľkosti v polyakrylamidovom géli a autorádiograficky vizualizované.

Prvou technikou enzymatického sekvenovania DNA bola v roku 1975 metóda „plus-mínus“, ktorou bol o dva roky kompletne prečítaný celý genóm bakteriofága ϕ X174 s 5386 nukleotidmi. Využívala DNA polymerázu I z *Escherichia coli* a DNA polymerázu bakteriofága T4 s rôznym množstvom limitujúcich deoxynukleotidov (dNTP). Detekcia vzniknutých produktov prebiehala elektroforézou v polyakrylamidovom géli.

Neskôr bola popísaná Sangerova enzymatická metóda. Využívala modifikované nukleotidy – dideoxynukleotidy (ddNTP, 2',3'-dideoxynukleozid-trifosfát), analógy normálnych stavebných jednotiek DNA – deoxynukleotidov (dNTP, 2'-deoxyribonukleozid-trifosfát), pôsobiacich

ako špeciálne inhibítory DNA polymerázy. Sangerovo sekvenovanie bolo postupne modifikované, a tak pôvodné radioaktívne značenie ddNTP vystriedalo fluorescenčné značenie, polyakrylamidová elektroforéza na rozdelenie fragmentov nových molekúl DNA bola nahradená kapilárovou a manuálne odčítavanie poradia báz vystriedali sofistikované automatizované počítačové softvéry. Zdokonaľovaním technológií sa proces sekvenovania plne zautomatizoval. Sangerova metóda sa stala zlatým štandardom a aj napriek svojej prácnosti a časovej náročnosti desaťročia patrila k najpoužívanejším a najspoľahlivejším sekvenačným metódam (1).

Tento popularite do veľkej miery napomohol Projekt sekvenovania ľudského genómu (HGP, Human Genome Project) (1990 – 2003) s cieľom určiť kompletnú nukleotidovú sekvenciu ľudskej DNA. Projekt trval 13 rokov a stál takmer 3 miliardy dolárov. Bola to zdĺhavá mravčia práca. Výsledkom bolo osekvenovanie 99 % ľudského genómu s veľkosťou 3,3 miliardy bázových párov (bp). Použité technológie vychádzali metodicky práve zo Sangerovej metódy, avšak boli doplnené prístupmi umožňujúcimi analyzovať dlhšie úseky DNA (1). Jednou z možností bolo tzv. „shotgun“ sekvenovanie, pri ktorom je DNA náhodne štiepená na krátke úseky, klonovaná do vektorov a potom následne osekvenovaná z oboch koncov. Získané úseky sa vzájomne prekrývajú, a tým umožňujú zostavenie celej sekvencie. Ďalší rozvoj sekvenovania individuálnych ľudských genómov bol nutne podmienený vznikom nových lacnejších a výkonnejších technológií (2):

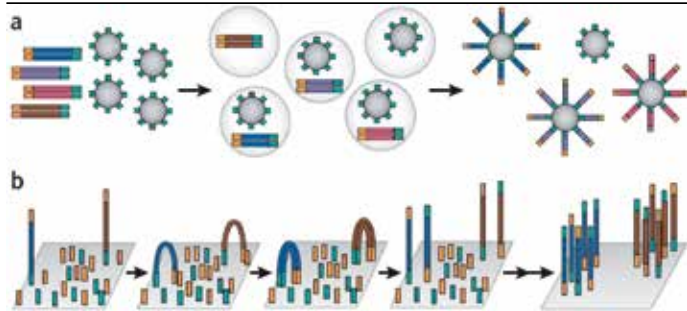
Sekvenovanie novej generácie (NGS; next generation sequencing)

Sekvenátory prvej generácie založené na Sangerovom princípe dosahovali zvýšenie sekvenačnej kapacity v zásade iba pridávaním kapilár, v ktorých prebiehala elektroforéza v prístroji. Najvýkonnejšie sekvenátory založené na kapilárovej elektroforéze umožňovali simultánnu analýzu 384-vzoriek a ich maximálny denný výkon bol na úrovni 2,2 Mb (Megabáz – milión báz) (3). S takýmto výkonom sa rutinné sekvenovanie genómov porovnateľných veľkosťou s ľudským nedalo rutinne realizovať. Dopyt po výkonnejšom a nízkonákladovom sekvenovaní mal za následok tlak na vývoj vysokovýkonných tzv. „high-throughput“ technológií. Princíp spočíva v paralelizácii tohto procesu a produkcii tisícov až miliónov sekvencií súčasne, preto sa NGS označuje aj ako masívne paralelné sekvenovanie.

Výstupom NGS je obrovský objem dát, ktoré je nutné roztriediť a spracovať. Problém teda nie je (možno prvýkrát v histórii) v získaní dostatočného množstva údajov, ale v ich zmysluplnej interpretácii. Štatistické modely a výpočtové algoritmy, ktoré mali doteraz viac-menej akademický význam, tým získali praktický rozmer. Nastal čas na etablovanie bioinformatiky.

V súčasnosti môžu byť NGS technológie rozdelené do dvoch základných kategórií. Prvú skupinu predstavujú platformy založené na PCR amplifikácii templátu (PCR-based technologies), nazývajú sa aj sekvenátory druhej generácie. Druhú skupinu tvoria technológie bez nutnosti amplifikačného kroku pred vlastnou sekvenáciou, ktoré využívajú tzv. Single-molecule sequencing a sú označované za sekvenátory tretej generácie (4, 5).

Obrázok 1. Schematické znázornenie princípu emulznej PCR a PCR v zhlukoch



(A) Emulzná PCR (emPCR, emulsion PCR): Amplifikácia DNA fragmentov na partikulách (beads). K fragmentom DNA sa z oboch strán ligujú adaptéry obsahujúce sekvencie umožňujúce naviazanie primerov využívaných pri amplifikačnej (aj následnej sekvenačnej) reakcii. Amplifikácia prebieha v emulzii vody a oleja s obsahom potrebných PCR reagentov, čo zabezpečuje optimálne prostredie. Podmienky emPCR sú optimalizované tak, aby sa v každej kvapke tejto emulzie nachádzala vždy len jedna partikula a jedna molekula DNA. Na povrchu partikul sú kovalentne naviazané oligonukleotidy so sekvenciou komplementárnou k adaptérovej sekvencii umožňujúcej naviazanie templátového DNA vlákna pre jeho následnú amplifikáciu. Pri tejto metóde dochádza k paralelnej a zároveň klonálnej amplifikácii miliónoch jednotlivých fragmentov na povrchu partikul v miliónoch kvapiek emulzie. Výsledkom je DNA knižnica pripravená na sekvenovanie. Túto techniku používajú sekvenátory 454/Roche a Life Technologies. (B) PCR v zhlukoch (cluster PCR, bridge PCR): K DNA fragmentom sa podobne ako pri emPCR z oboch strán ligujú adaptéry. DNA fragment sa vďaka tomu môže viazať na oligonukleotidy kovalentne viazané na povrchu prietokovej komôrky (flow cell). Dochádza k syntéze jeho komplementárneho vlákna, ktoré už je naviazané na povrchu prietokovej komôrky. Následne je novovzniknuté vlákno ohnuté a komplementárne sa viaže na susediaci oligonukleotid zodpovedajúci sekvenčnému adaptéru na druhej strane tohto vlákna (prípomína most). Proces amplifikácie sa opakuje, až kým nevznikne približne 1 000 kópií daného DNA fragmentu v tesnej blízkosti, čím sa vytvorí zhluk/klaster funkčne ekvivalentný jednej partikule (bead) po emPCR. Túto techniku používajú sekvenátory Illumina (6)

Sekvenátory druhej generácie

V priebehu posledných rokov sa objavujú na trhu rôzne prístupy NGS technológií ponúkané niekoľkými firmami, ktoré si navzájom konkurujú. V dôsledku patentovej ochrany zvolili navzájom mierne odlišné prístupy avšak so všeobecne podobným princípom. Väčšina vychádza z pomerne krátkych fragmentov DNA, z prípravy templátu a vytvorenia knižnic amplikónov emulznou PCR (emPCR) alebo PCR v zhlukoch (cluster PCR), nazývanou aj tzv. „bridge“ PCR. Stručný popis princípu oboch metód PCR znázorňuje obrázok 1.

Nasleduje samotné sekvenovanie založené na syntéze alebo ligácii s detekciou inkorporovaných nukleotidov a analýza získaných dát (6).

Každý výrobca rieši tieto základné kroky inou kombináciou uvedených možností, z čoho vyplýva rozdielna špecifita, senzitivita a rôzna miera chybovosti. Pri porovnávaní rovnakej sekvencie tak môžu vzniknúť rozdiely v type a množstve produkovaných dát a ich rôznej interpretácii (7). Hlavnými protagonistami NGS revolúcie sú štyri platformy.

454 LifeScience (Roche)

Prvá NGS platforma bola komerčne dostupná v roku 2005. Princípom technológie je kombinácia emPCR a pyrosekvenovania. Pyrosekvenovanie možno zjednodušene definovať ako real-time sekvenovanie, pri ktorom sa sledom enzymatických reakcií deteguje svetelný signál uvoľnený pri zabudovaní dNTP do vznikajúceho reťazca DNA. Množstvo uvoľneného svetla je úmerné počtu začlenených nukleotidov. Výhodou tejto metódy je rýchlosť a dĺžka prečítanej sekvencie. Technológia 454 začínala s dĺžkou sekvencie 400 bp a v roku 2013 sa pohybovala na úrovni 1 000 bp. Optimálna dĺžka čítanej sekvencie je 700 bp, čo je porovnateľné so Sangerovou metódou. V roku 2007 bol touto NGS technológiou prvýkrát prečítaný genóm Jamesa Watsona a trvalo to dva mesiace (8). V súčasnosti je táto technológia na ústupe najmä v dôsledku vysokých prevádzkových nákladov.

Illumina (Solexa)

Druhou NGS platformou uvedenou na trh v roku 2006 bol sekvenátor firmy Solexa, ktorý o rok neskôr odkúpila spoločnosť Illumina. Metóda je založená na sekvenačnej reakcii syntézou s využitím fluorescenčne značených reverzibilných terminátorov a bridge PCR. Pri sekvenovaní možno postupovať dvoma spôsobmi, buď sa sekvencia prečíta v jednom smere (single-read) alebo sa postupuje proti sebe z oboch koncov (pair-end read). Spoločnosť Illumina v súčasnosti dominuje na NGS poli a ponúka niekoľko prístrojov rôznej výkonnosti: MiSeq (2 x 300 bp), MiSeqDx (2 x 125 bp), NextSeq 500 (2 x 150 bp), HiSeq2500 (2 x 250 bp) a HiSeq X Ten. HiSeq X Ten sa skladá z 10 ultravysokokapacitných sekvenátorov a dnes je najvýkonnejšou sekvenačnou platformou, ktorá prekonáva cenovú bariéru 1 000 dolárov za osekvenovanie jedného ľudského genómu. Zameraná je najmä na populačné štúdie. Illumina platformy ovládajú trh najmä vďaka vysokej výkonnosti sekvenátorov, robustnosti realizácie, kapacite a priaznivej cenovej relácii prevádzky (9).

SOLiD System (Life Technologies)

Tretí typ sekvenátora predstavila v roku 2007 vtedy ešte spoločnosť Applied Biosystems (dnes Life Technologies). SOLiD systém (Sequencing

by Oligonucleotide Ligation and Detection) pracuje na princípe emPCR a sekvenovaní DNA ligázou. Využívajú sa fluorescenčne značené oktamérové úseky s dvoma definovanými bázami (10). Tento dvojbázový kódovací systém zaručuje prečítanie každého nukleotidu dvakrát, čím sa zvyšuje presnosť, s akou je určené poradie nukleotidov danej sekvencie. Medzi uvedenými NGS platformami má teda SOLiD systém najnižšiu chybovosť. V súčasnosti sú v ponuke dva varianty sekvenátora: 5500 System a 5500xl System, ktorý výrazne zvýšil dĺžku čítania z pôvodných 35 bp na 75 bp a zlepšil aj presnosť meraní na 99,99 %.

Ion Torrent (Life Technologies)

Technológia Ion Torrent sa objavila na scéne v roku 2010 a ako jediná využíva namiesto optického/svetelného spôsobu zaznamenávania jednotlivých nukleotidov detekciu elektrochemického signálu. Inkorporácia nukleotidu do rastúceho reťazca DNA spôsobí uvoľnenie vodíkového iónu (H⁺), čím dôjde k zmene pH. Proces prebieha na polovodičovom čípe husto pokrytom mikrojamkami, pod ktorými je umiestnený senzor citlivý na zmenu pH. Celkové množstvo produkovaných dát je určené hustotou jamiek na čípe. Samotná príprava knižnice prebieha podobne ako v predchádzajúcich metódach napojením adaptérov s následnou emPCR a sekvenačnou reakciou syntézou. Výhodou by malo byť, že pri sekvenovaní sa využívajú nemodifikované nukleotidy. Ion Torrent aktuálne ponúka Ion PGM Sequencer (314/316/318 chips) a Ion Proton System (I, II, III), pričom model Ion Proton Sequencer s mikročipom Ion PII Chip je schopný prečítať celý genóm človeka v priebehu jedného dňa. Prvý ľudský genóm osekvenovaný technológiou Ion Torrent bol genóm Gordona Moora (10, 11).

Sekvenátory tretej generácie

Výraznú zmenu predstavujú metódy, ktoré nie sú založené na tomto namnožení sekvenovaných úsekov. Nevyužívajú tak amplifikačný krok, čo znižuje výskyt spontánnych mutácií vzniknutých chybovosťou DNA-polymerázy. Pri klonovaní DNA pomocou PCR môže dôjsť k zámene niektorých báz a tým aj k rôznemu počtu výskytu jednotlivých fragmentov, čo môže ovplyvniť výsledok experimentu.

Prvý prístroj, ktorý stál na prahu tretogeneračnej technológie sekvenovania, predstavila firma Helicos Bioscience v roku 2007. Metóda využíva jednotlivé individuálne molekuly DNA (tSMS, True Single Molecule Sequencing) pevne fixované k povrchu. Sekvenačná reakcia prebieha syntézou s fluorescenčne značenými nukleotidmi. Zavedeniu tohto analyzátora do praxe bránila vysoká cena prístrojov a dĺžka čítanej sekvencie (30 – 35 bp). V súčasnosti nie je technológia ďalej vyvíjaná (12).

SMRT (Pacific Bioscience)

V roku 2009 prišla na trh nová technológia, ktorá sekvenuje jednotlivé molekuly DNA v reálnom čase (SMRT, single-molecule real-time). Systém využíva čipy pokryté nanoštruktúrovým materiálom, ktorý vytvára jamky (ZMW, Zero Mode Waveguide) na dne s fixovanou DNA polymerázou. Sekvenačný proces prebieha syntézou DNA vlákna podľa templátovej DNA s pomocou fluorescenčne značených nukleotidov. Vzhľadom na to, že tento prístup nevyžaduje premývacie kroky pri začleňovaní jednotlivých

typov nukleotidov (wash-and-scan) nevyhnutných pri analyzátoroch druhej generácie, celý proces sekvenovania sa zrýchľuje. Súčasným lídrom v tejto oblasti je systém PacBio RS a v porovnaní so sekvenátormi druhej generácie dosahuje priemernú dĺžku čítania 5 500 – 8 500 bp. Okrem toho môže aj priamo detegovať epigenetické modifikácie, ako je 4-metylcytozín, 5-metylcytozín a 6-metyladenín (13).

Nanopore sequencing (Oxford Nanopore)

Sekvenovanie pomocou nanopórov je založené na meraní elektrického prúdu prechádzajúceho cez biologický proteín tvoriaci pór v nevodivej membráne. Analytom je jednoreťazová molekula DNA, pri jej prechode nanopórom dôjde k detekcii jednotlivých nukleotidov, pričom pre každý typ nukleotidu je vopred určená modulácia prúdu. Technológia má minimálne požiadavky na reagentie i prípravu vzorky, je lacná, rýchla a ponúka analýzu DNA v reálnom čase. V súčasnosti firma Oxford Nanopore ponúka analyzátory MinION™, PromethION™ a GridION™ (13, 14).

NGS technológie sekvenovania sa neustále modifikujú a prudko napredujú. Dnes vieme s istotou povedať len to, že sú výrazne rýchlejšie ako v minulom roku a pomalšie ako v budúcom roku.

Aplikácia a využitie NGS technológií

Vysoký výkon súčasných sekvenátorov je možné použiť v širokom spektre aplikácií, od pokrytia rozsiahlej oblasti celého genómu (ultraširoké sekvenovanie), po sekvenovanie iba jednej oblasti s vysokým počtom čítaní (ultrahlboké sekvenovanie). Výhoda ultrahlbokého sekvenovania je detekcia variantov, ktoré sa vo vzorke vyskytujú s nízkou frekvenciou a prínos ultraširokého sekvenovania spočíva v analýze vzoriek viacerých pacientov v kratšom čase. Pre špecifické účely môžeme teda využiť celogenómové sekvenovanie zahŕňajúce *de novo* sekvenovanie a resekvenovanie genómov, exomové sekvenovanie kódujúcich častí DNA, sekvenovanie transkriptómu, ktorý predstavuje súbor všetkých molekúl RNA (mRNA, rRNA, tRNA a ďalšie nekódujúca RNA molekuly) a cielečné resekvenovanie (targeted resequencing) umožňuje sekvenovať iba vybrané gény alebo vymedzenú oblasť genómu (15).

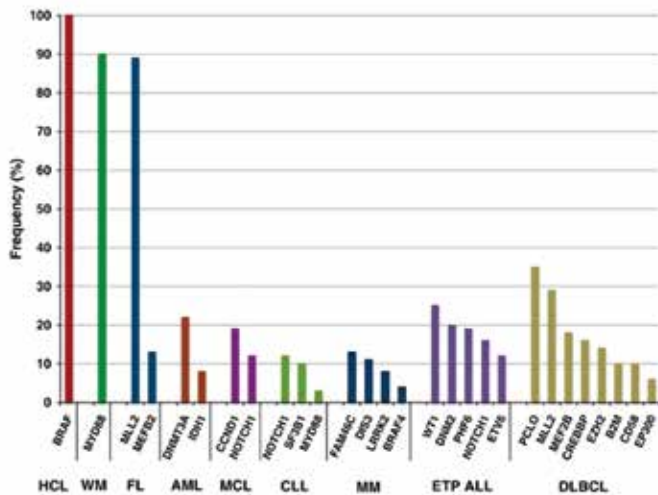
NGS technológie ponúkajú celú plejádu možností ich využitia nielen v medicíne, ale aj v iných vedných odboroch. Významné uplatnenie nachádzajú napríklad v mikrobiomike zaoberajúcej sa genomickými analýzami mikroorganizmov, kde umožňuje definovať napríklad mikrobióm človeka, v metagenomike, kde umožňujú stanoviť druhy baktérií (a nielen baktérií) vyskytujúcich sa vo vzorkách pôdy, vody. Vo forenznej genetike rezonuje potenciálny prínos epigenetických štúdií zameraných na odlíšenie monozygotných (jednovaječných) dvojčiat, ktoré majú rovnakú sekvenciu DNA a klasickými genetickými metódami sa nedali dosiaľ rozoznať. Vo fylogenetike NGS umožňuje študovať evolučný vývoj a vzťahy medzi organizmami prostredníctvom celogenómových komparatívnych analýz. (1 – 2, 4 – 6, 15 – 17).

Odborom, do ktorého NGS sekvenovanie prinieslo doslova revolúciu, je nádorová genomika. Realizovali sa rozsiahle vedecké projekty, ktoré prispeli ku komplexnejšej a k podrobnejšej charakteristike molekulovej podstaty nádorových ochorení. Tieto štúdie dopomohli k objaveniu nových génov asociovaných s daným ochorením a k stanoveniu genetického profilu

nádoru (18). Obrázok 2 znázorňuje prehľad detegovaných somatických mutácií vo vybraných onkohematologických malignitách.

Z klinického hľadiska sú NGS technológie sľubným nástrojom s priamym vplyvom pri nahradení alebo doplnení existujúcich laboratórnych algoritmov: napríklad detekcia chromozómových aneuploidii DNA plodu pri neinvazívnej prenatalnej diagnostike, identifikácia vzácných genetických variantov ochorení s mendelovskou dedičnosťou, pri identifikácii zárodočných mutácií pri familiárnych syndrómoch. Potenciálne využitie je aj pri včasnej diagnostike širokého spektra tumorov, analýzou voľne cirkulujúcej nádorovej DNA v plazme, napríklad detekcia mutácií pri kolorektálnom karcinóme, mutačný status tumor- supresorových génov a chromozómových prestavieb pri lymfómoch alebo leukémiách, detekcia DNA vírusov asociovaných s určitým typom nádoru (EBV – nazofaryngeálny karcinóm, HPV – cervikálne lézie) (17 – 20).

Obrázok 2. Najčastejšie somatické mutácie *de novo* detegované metódami NGS v génoch hematologických malignít



Vysvetlivky: HCL – vlasatobunková leukémia, WM – Waldenströmova makroglobulinémia, FL – folikulový lymfóm, MCL – lymfóm z plášťových buniek, CLL – chronická lymfocytová leukémia, MM – mnohopočetný myelóm, ETP ALL – prekurzorová T-bunková akútna lymfoblastová leukémia, DLBCL – difúzny veľkobunkový B-lymfóm (18)

Záver

Technológie NGS sa od svojho zavedenia významne etablovali v oblasti základného i aplikovaného genetického výskumu a začínajú vstupovať na pôdu klinickej diagnostiky. Pokiaľ skutočne dospejeme k rutinnému používaniu NGS, bude nevyhnutné vyriešiť niekoľko prekážok a otázok. Vygenerované množstvo primárnych dát je nutné správnym spôsobom uchovať a anotovať, efektívne analyzovať, ale predovšetkým správne interpretovať. Určenie kvality sekvenančných výstupov komplikuje aj absencia medzinárodných štandardov a súčasná rýchlosť regulačných orgánov, ktoré sú prekonané tempom vývoja NGS technológií. Musíme aktívne pristúpiť k edukácii nielen lekárskej obce, ale aj širokej verejnosti,

s cieľom správne pochopiť, vysvetliť a použiť získané informácie. Hádame do obdobia, keď sa táto vyhliadka stane reálnou, budeme mať aj náležitý progresívny zákon o DNA, pretože ide o dáta nielen citlivé, ale najmä cenné z viacerých aspektov.

Tento článok vznikol vďaka podpore v rámci OP Výskum a vývoj pre projekt: Centrum výskumu závažných ochorení a ich komplikácií. ITMS 26240120038, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- Hutchison CA. DNA sequencing: bench to bedside and beyond. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(18):6227–6237.
- Pospišilová Š, Tichý B, Mayer J. Sekvenování lidského genomu – technologie nové generace aneb budeme rutinně sekvenovat lidské genomy? *Čas Lék Čes.* 2009;148:296–302.
- Shibata K, Itoh M, Aizawa K, et al. RIKEN Integrated Sequence Analysis (RISA) System 384-Format Sequencing Pipeline with 384 Multicapillary Sequencer. *Genome Res.* 2000;10(11):1757–1771.
- Metzker ML. Sequencing technologies – the next generation. *Nat Rev Genet.* 2010;11:31–46.
- Anderson M, Schrijver I. Next Generation DNA Sequencing and the Future of Genomic Medicine. *Genes.* 2010;1(1):38–69.
- Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology.* 2008;26:1135–1145.
- Liu L, Li Y, Li S, et al. Comparison of next-generation sequencing systems. *J Biomed Biotechnol.* 2012;251364. doi: 10.1155/2012/251364.
- www.roche.com
- www.illumina.com
- www.lifetechnologies.com
- Rothberg JM, Hinz W, Rearick TM, et al. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature.* 2011;457:348–352.
- Schadt EE, et al. A window into third-generation sequencing. *Hum Mol Genet.* 2010; 19(R2): R227.
- van Dijk, EL, Auger H, Jaszczyszyn Y, et al. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends Genet.* 2014;30(2014):418–426.
- www.nanoprotech.com
- Travis C, Glenn Field guide to next-generation DNA sequencers. *Molecular Ecology Resources.* 2011;11:759–769.
- Yang Y, Xie B, Yan J. Application of Next-generation Sequencing Technology in Forensic Science. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* 2014;12:190–197.
- Desai AN, Jere A. Next-generation sequencing: ready for the clinics? *Clin Genet.* 2012; 81:503–510.
- Braggio E, Egan JB, Fonseca R, et al. Lessons from next-generation sequencing analysis in hematological malignancies. 2013;3:e127; doi:10.1038/bcj.2013.26.
- Yu J, Gu G, Ju S. Recent Advances in Clinical Applications of Circulating Cell-free DNA Integrity. *Lab Med.* 2014;45(1): 6–12.
- Chan M, Lee CH WH, Wu M. (2013) Integrating Next-Generation Sequencing Into Clinical Cancer Diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn.* 13(7):647–650.



RNDr. Radka Tomášová
MEDIREX GROUP ACADEMY, n. o., člen MEDIREX GROUP
 Galvaniho 17/C, 820 14 Bratislava
 radka.tomasova@medirex.sk