

Nova generacija sekvenciranja u veterinarskoj medicini - pregled I. dio



K. Vlahović*, G. Gregurić Gračner, M. Pavlak, D. Špoljarić, L. Pajurin i M. Popović

Sažetak

Završetkom projekta sekvenciranja ljudskoga genoma, omogućen je znatan napredak u molekularnoj biologiji čime se otvaraju novi viditci, kao i mogućnosti i u veterinarskoj medicini. Nova generacija sekvenciranja predstavlja znatan tehnološki napredak, koji omogućuje velik napredak u poznavanju genoma životinja te sve širu primjenu u različitim područjima veterinarske

medicine. U radu su detaljno opisane različite metode novih generacija sekvenciranja, navodeći prednosti i nedostatke svake od platformi, prikazana je i povijest razvoja sekvenciranja kao i njezin daljnji razvoj i buduća primjena.

Ključne riječi: DNK, genomi životinja, nova generacija sekvenciranja, molekularna genetika, povijest

Uvod

Razvoj tehnologija nove generacije sekvenciranja, skraćeno „NGS“ (engl. *Next Generation Sequencing*) je širom svijeta u velikom zamahu čime se otvara mogućnost novih dosegâ i u području veterinarske medicine. Na području veterinarskih znanosti NGS olakšava istraživanje bioloških sustava na razini koja donedavno nije bila moguća. Neupitna prednost tehnologija NGS povezana je s gotovo neograničenim uvidom u genske informacije različitih organizama, preciznijom analizom njihovih genoma te primjenom u novim znanstvenim

disciplinama poput metagenomike, epigenomike, transkriptomke i proteomike (Budimir i sur., 2014., Crnjac i sur., 2016., Park i Kim, 2016., Dunisławska i sur., 2017., Bilić i sur., 2018., Mršić i sur., 2018.). Na temelju rezultata više znanstvenih studija razvidno je da NGS ima posebno značenje u izravnoj analizi genoma, proučavanju strukture i funkcije njihovih gena, analizi genske ekspresije, istraživanju metilacije DNK (engl. *deoxyribonucleic acid*, DNA; hrv. deoksiribonukleinska kiselina, DNK), sekvenciranju transkriptoma, rekvenciranju,

Dr. sc. Ksenija VLAHOVIĆ*, (dopišni autor, e-mail: vlahovic@vef.hr), dr. med. vet., redovita profesorica, dr. sc. Gordana GREGURIĆ GRAČNER, dr. med. vet., izvanredna profesorica, dr. sc. Marina PAVLAK, dr. med. vet., redovita profesorica, dr. sc. Daniel ŠPOLJARIĆ, dr. med. vet., docent, Luka PAJURIN, dr. med. vet., asistent na projektu Hrvatske zaklade za znanost, dr. sc. Maja POPOVIĆ, dr. med. vet., redovita profesorica, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska

analizi genoma mitohondrija te samim tim pomaže boljem razumijevanju djelovanja nasljedne osnove u životinja (Robertson i sur., 2007., Fehniger i sur., 2010., Van Borm i sur., 2015., Heather i Chain, 2016., Dunisławska i sur., 2017., Howson i sur., 2017.).

NGS danas doprinosi boljem razumijevanju odnosa životinja, ljudi i okoliša na razini njihovih genoma (genomika), transkriptoma (transkriptomika) ili proteoma (proteomika) (Ceciliani i sur., 2014., Moreno Switt i Toledo, 2015., Van Borm i sur., 2015.). Znatni doprinos NGS očituje se u iznimno pouzdanom dokazu uzročnika bolesti, od metagenomske identifikacije nepoznatih mikrobnih zajednica pa do molekularne epidemiologije. Do prije nekoliko godina, tehnologije NGS postaju sve dostupnije u manjim dijagnostičkim laboratorijima što se značajno počinje odražavati na dijagnosticiranje, kontrolu, nadzor i sprječavanje zaraznih bolesti (Van Borm i sur., 2015., Moreno Switt i Toledo, 2015., Dunisławska i sur., 2017.). Još znatniji napredak u poznavanju genoma te šira primjena NGS-a u dijagnostici bolesti čovjeka i životinja očekuje se nakon uvođenja treće generacije metoda sekvenciranja DNK. Dijelom je napredak već uslijedio kroz razvoj znanosti i tehnologije koja omogućuje sekvenciranje u stvarnom vremenu (engl. *Real Time Sequencing*), a obuhvaća monomolekularno sekvenciranje u stvarnom vremenu (engl. *Single Molecule Real Time Sequencing*, SMRT) i sekvenciranje pomoću nanopora (Heather i Chain, 2016., Jain i sur., 2018.).

Konačno, predviđa se i opsežnija primjena NGS u molekularnoj taksonomiji, filogenetskim istraživanjima životinja, identifikaciji vrsta, genezi pasmina i tijeku mutacija (Hebert i sur., 2003.a,b, Moritz i Cicero, 2004., Ivanković, 2005.). NGS naći će svoju primjenu u znanstvenim područjima od arheologije i evolucije do osnovnih bioloških znanosti (Evans i sur., 2017.).

Osnovna je svrha i cilj ovog preglednoga članka osvrnuti se na naprednu tehnologiju određivanja genskog slijeda s naglaskom na primjeni u veterinarskim istraživanjima, posebice s obzirom na mogućnost korištenja najsuvremenijih tehnologija novih generacija sekvenciranja. Stoga su u radu opisane različite metode novih generacija sekvenciranja pri čemu smo nastojali ukazati na prednosti i nedostatke svake od platformi, kao i njihovu primjenu u budućnosti. Predstavili smo kratku povijest razvoja sekvenciranja kao i njene buduće mogućnosti koje bi uslijedile kao rezultati iznimno velikih i brzih promjena u razvoju tehnologije sekvenciranja.

Tijek razvoja istraživanja molekule DNK

Osnovne principe nasljeđivanja postavio je svećenik Gregor Mendel, još 1865. godine na osnovi istraživanja križanja graška. Mendelovo otkriće, uglavnom je zapostavljeno do 1900. godine, kada je pažnja znanstvene javnosti ponovno usmjerena na njih. Njegov rad poticao je znanstveno traganje za razumijevanjem genske informacije. Nobelovci Watson i Crick riješili su trodimenzionalnu strukturu molekule DNK 1953. godine (Watson i Crick, 1953.). Pritom su koristili fotografije s kristalografskim podacima koje su izradili Rosalind Franklin i Maurice Wilkins koji su svojim radom doprinijeli razumijevanju procesa umnažanja molekule DNK. Međutim, određivanje točnog slijeda (sekvence, niza) nukleotida u molekuli DNK još neko vrijeme nije bilo moguće. Prema Sanger i sur. (1977.) godine 1965. uspjela se odrediti prva cijela sekvenca nukleinske kiseline za alanin tRNK i to iz pivskog kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. Istovremeno, Sanger i suradnici razvijali su tehnologiju temeljenu na otkrivanju radioaktivno obilježenih fragmenta, što je omogućilo

istraživačima sve preciznije i obuhvatnije određivanje sljedova nukleotida. Sedamdesetih godina prošlog stoljeća, otkrivene su i korištene prve metode sekvenciranja terminacijom sinteze lanca (engl. *Chain Termination Method*). Uz pomoć svojih suradnika, Sanger 1977. godine sekvencira genom bakteriofaga ϕ X174 veličine 5375 nukleotida (Sanger i sur., 1977.), a istovremeno su objavljene i dvije metode sekvenciranja DNK: Maxam-Gilbertova metoda sekvenciranja i Sangerova metoda sekvenciranja. Unatoč tome što su početci sekvenciranja bili vrlo uspješni, samo sekvenciranje ljudskoga genoma još uvijek je predstavljalo izniman izazov (Lander, 2011.).

Organizacija jezgrinog i mitohondrijskog genoma

Projekt ljudskog genoma (engl. *Human Genome Project*, HGP) rezultirao je prvim cjelovitim sekvencama ljudskoga genoma. Objava rezultata omogućila je da genetička istraživanja značajno doprinesu u dijagnosticanju i liječenju te potaknu razvoj mnogih područja biologije i biomedicine. Uspjeh ovog projekta ubrzao je sekvenciranje genoma i drugih organizama te ujedno skrenuo pozornost znanstvenika na mogućnost korištenja genomike u području veterinarske medicine. Dvije su nezavisne istraživačke skupine bile prve koje su napravile skice sljedova humanog genoma: *International Human Genome Sequencing Consortium* i *Celera Genomics*. Jedna od prvih studija o ljudskom genomu, prikazala je 90 % određenosti slijeda ljudskoga genoma (Venter i sur., 2001.). Potom je 2003. godine, upotpunjen ljudski genom uz prikaz dodatnih informacija koje opisuju slijed 99 % sekvenca ljudskoga genoma (Marroquin, 2007.). U istraživanjima Makałowskog 2001. godine, objavljeni su detaljni podaci o strukturi i organizaciji ljudskoga

genoma. Ista studija otkrila je da su genske informacije u ljudi kodirane s dva genoma i to genomom jezgre i genomom mitohondrija. Broj parova baza ljudskoga genoma jezgre iznosi $3,2 \times 10^9$ pakiranih u 23 kromosoma različite veličine. Kodirajuće sekvence čine svega nekoliko postotaka ljudskog genoma jezgre, dok većinu genoma (oko 50 %) čine ponavljajuće sekvence i nekodirajuće jedinstvene sekvence (Makałowski, 2001.). Kao nastavak projekta ljudskoga genoma pokrenut je novi projekt s ciljem određivanja svih funkcionalnih elementa ljudskoga genoma (*Encyclopedia of DNA Elements*, ENCODE) (Birney i sur., 2007.). U okviru navedenog projekta te u drugim istraživačkim projektima svakodnevno se otkrivaju milijuni novih regulatornih elemenata u ljudskom genomu koji na različite načine upravljaju načinom izgradnje proteina. Istraživanja genoma i njihovih gena proširuju se i na druge organizme, posebno sisavce. Primjerice, jedan međunarodni istraživački tim predvođen Kerstinom Lindblad-Tohom na Sveučilištu Broad (SAD), i Sveučilištu Uppsala (Švedska), svoje rezultate mapiranja i usporedbe genoma 29 različitih vrsta sisavaca objavio je u časopisu *Nature* (Lindblad-Toh, 2011.).

Posljednjih nekoliko desetljeća provodena su istraživanja sekvenciranja čitavih genoma, što je dovelo do sekvenciranja ukupnih genomskih redoslijeda bakterija, kvasaca, životinja, biljaka i čovjeka. Potpuni redoslijedi genoma jezgre i genoma mitohondrija otkrili su bezbroj gena koji do tada nisu bili prepoznati. Opisan ukupni redoslijed staničnih genoma različitih organizama daje znanstvenicima bogatstvo informacija, među kojima su i otkrića do sada nepoznatih detalja smještaja i pakiranja molekule DNK. Kao što smo prije naveli, određen je broj parova baza ljudskog genoma jezgre. Ujedno, spoznaje se duljina ukupnog genoma jezgre koja je duga više od jednog metra

i smještena je u strukturama koje se nazivaju kromosomima (riječ kromosom izvedenica je od dviju grčkih riječi - *chromos*, što znači boja, i *soma*, što znači tijelo). Svaki kromosom prije replikacije sadržava po jednu molekulu DNK.

Svaka stanica u organizmu sadrži kopiju genoma cijeloga organizma u obliku sekvence deoksiribonukleotida. Osnovna genenska informacija smještena je u genomu jezgre, dok se u citoplazmi nalaze stanične strukture koje održavaju stanicu na životu. Jedna od tih staničnih struktura je i mitohondrij. Genom jezgre genski je materijal koji nosi nasljednu poruku. Geni su aktivni segmenti koji se nalaze na točno određenim mjestima (lokusima) lanaca DNK uzvojnice. Zahvaljujući normalnom funkcioniranju gena, svaka jedinka ima određene parametre rasta i razvoja organizma. Genom jezgre građen je u obliku dvostruke uzvojnice i smješten je u svim kromosomima. DNK čine jedinice zvane nukleotidi. Sam nukleotid sastavljen je od triju podjedinica, i to: pet-ugljičnog šećera, fosfatne skupine i nukleotidnih baza koje sadržavaju dušik, a zovu se: adenin (A), gvanin (G), citozin (C) i timin (T). U dvostrukom lancu adenin se uvijek spaja s timinom (A-T), a citozin s gvaninom (C-G) i u normalnim uvjetima nije moguće sparivanje baza po bilo kojoj drugoj shemi. Svaki pojedinačni kontakt između navedenih jedinica naziva se par baza (pb), a cijeli ljudski genom ima oko 3 milijarde parova baza (Primorac i sur., 2009.).

Poput DNK genoma jezgre, mitohondriji su važni jer sadržavaju vlastiti genski sustav, koji se nasljeđuje izravno putem majčinske linije, a sva braća i sestre imaju isti slijed genoma mitohondrija. U velikom broju istraživanja dana je prednost analizi genoma mitohondrija pred analizom genoma jezgre. Razlog tome je haploidni način nasljeđivanja, ograničena rekombinacija, nedostatak introna te

činjenica da je genom mitohondrija bogat izvor molekula DNK, čak i kada je uzorak tkiva ograničen. Štoviše, svaka stanica ima različiti broj mitohondrija (do nekoliko tisuća). Genomi mitohondrija obično su kružne molekule DNK, slične bakterijskim genomima. Poput genoma jezgre i genom mitohondrija može biti izmijenjen različitim brojem mutacija nastalih tijekom evolucije u svojim pojedinim dijelovima, što omogućava rješavanje filogenetskih pitanja na različitim taksonomskim razinama (Hebert i sur., 2003.a, Blaxter Mark i sur., 2004., Purty i Chatterjee, 2016.). Zatvorena kružnica genoma mitohondrija čovjeka, veličine je oko 16,5 kb i kodira dvije rRNK, 22 tRNK i 13 proteina (Anderson i sur., 1981.).

Sljedovi čitavih genoma različitih organizama

Početna istraživanja bila su usmjerena na izdvajanje i upoznavanje jednog gena sve do novog pristupa istraživanjima koja rezultiraju otkrivanjem organizacije i genskog sadržaja čitavog genoma. Oni tako vode prema određivanju svih gena nekog organizma kao i njihove strukture i funkcije. Poznavanje organizacije i redoslijeda genoma jezgre doprinijelo je potom boljem razumijevanju genskih oštećenja, populacijskih struktura i evolucijske povijesti životinja (McKay i sur., 2008., Berry i sur., 2011., Alföld i Lindblad-Toh, 2013.). Bogatstvo informacija koje proizlaze iz određenog genskog slijeda genoma jezgre u ljudi, zajedno s poznatim sljedovima genoma jezgre drugih organizama, oblikuju novi okvir za proučavanje molekularne i stanične biologije. Očekuje se da će u budućnosti sekvenciranja cijelih genoma jezgre imati znatan utjecaj na naše razumijevanje i liječenje bolesti u životinja i ljudi. U tabeli 1. kronološki prikazujemo otkrića sljedova genoma jezgre različitih organizama s javno dostupnim cjelovitim sekvencama.

Tabela 1. Kronološki prikaz slijeda sekvenciranja genoma različitih organizama s javno dostupnim cjelovitim sekvencama njihovih genoma jezgre

Potpuno sekvencirani genomi jezgre	Autori
Bakterije, <i>Mycoplasma genitalium</i>	(Fraser i sur., 1995.)
Bakterije, <i>Haemophilus influenzae</i>	(Fleischmann i sur., 1995.)
Pivski kvasc, <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(Galibert i sur., 1996.)
Nematode, <i>Caenorhabditis elegans</i>	(<i>Sequencing Consortium C. elegans</i> , 1998.)
Vinske mušice, <i>Drosophila melanogaster</i>	(Adams i sur., 2000.)
Komarca, <i>Anopheles gambiae</i>	(Holt i sur., 2002.)
Ribe, <i>Fugu rubripes</i>	(Aparicio i sur., 2002.)
Perad	(Hillier i sur., 2004.)
Pas	(Lindblad-Toh i sur., 2005.)
Mačka	(Pontius i sur., 2007.)
Govedo	(Zimin i sur., 2009.)
Ovca	(Archibald i sur., 2010.)
Svinja	(Groenen i sur., 2012.)
Konj	(Orlando i sur., 2013.)

Najznačajnija otkrića u molekularnoj biologiji svakako predstavljaju rezultati nukleotidnog slijeda ukupnog ljudskog genoma, ali i niza različitih organizama. Izdvojit ćemo i predstaviti tri skupine organizama kojima je među prvima otkriven ukupan redoslijed parova baza u genomu jezgre te sadržaj i broj gena što je kasnije omogućilo otkrivanje funkcija pojedinih gena te njihove organizacije:

1. *prokariotski (bakterijski) genomi*: u potpunosti su sekvencirani genomi većeg broja različitih bakterija, među kojima je i onaj *E. coli* K-12 (Blattner i sur., 1997.), dok je prvi slobodno živući organizam sekvenciran 1995. godine bila bakterija *Haemophilus influenzae* (Fleischmann i sur., 1995.).
2. *kvašćev (eukariotski jednostanični organizam) genom*: prvi sekvencirani eukariotski jednostanični organizam bio je genom kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (Galibert i sur., 1996.).
3. *animalni (višestanični organizam) genom*: prvi sekvencirani genom nekog višestaničnog organizma bio je genom

nematode *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans Sequencing Consortium*, 1998.) i vinske mušice *Drosophila melanogaster* (Adams i sur., 2000.).

Veličina genoma jezgre i genoma mitohondrija izražava se kroz broj parova baza (nukleotida) u genomu ili kroz broj gena. Međutim, moramo napomenuti da većina genoma nije proporcionalan s genskom složenošću organizma. Tako složeniji (višestanični) organizmi ne moraju nužno imati više nukleotida ili više gena od jednostavnijih (jednostaničnih) organizama. Primjera radi, jedan od genoma s najvećim brojem gena (60 000) pripada bičasu *Trichomonas vaginalis* koji prouzroči trihomonijazu (DeMiguel i sur., 2010., Hirt i sur., 2011.). Drugu krajnost predstavljaju vrlo mali genomi nekih bakterija. Smatra se da *Mycoplasma genitalium* u odnosu na sve druge bakterije ima najmanji genom (od svega 580,070 parova baza). Na njezinom genomu prepoznato je ukupno samo 470 područja predviđenih za kodiranje, koja

uključuju gene potrebne za replikaciju, transkripciju i translaciju DNK, popravak DNK, stanični transport i metabolizam energije (Fraser i sur., 1995.).

Osim istraživanja genoma jezgre slijede otkrića redoslijeda i organizacije genoma mitohondrija u miševa i ljudi (Anderson i sur., 1981., Bibb i sur., 1981.). Općenito gledajući, analize sekvenciranja genoma mitohondrija pokazale su se informativnim u epidemiološkim studijama (Jex i sur., 2010.). Također su otkrivene posebnosti nekih genoma mitohondrija u različitim organizama. Kao primjer navodimo da se položaj gena u genomu mitohondrija peradi dijelom razlikuje od genoma drugih domaćih životinja. Razlika se očituje u položaju gena tRNK(Glu) i ND6 koji je lociran neposredno do D-loop regije. Druga istraživanja pokazuju da se na tom mjestu u drugih vrsta životinja nalazi gen za citokrom b, tRNK(Pro) i tRNK(Thr). Postoji još jedna posebnost u genomu mitohondrija peradi, a to je odsutnost mjesta početka umnažanja lakog lanca između gena tRNK(Cys) i tRNK(Asn), kojeg nalazimo u svih drugih kralježnjaka (Ivanković, 2005.).

Redoslijed pojavljivanja novih metoda sekvenciranja

Metode sekvenciranja molekula DNK dijele se, s obzirom kada su primjenjivane, na tri generacije (Heather i Chain, 2016.):

- prvu generaciju sekvenciranja DNK čine Sangerova i Maxam-Gilbert metoda, koje za pretraživanje koriste elektroforezu na poliakrilamidnom gelu,
- potom nastupa druga generacija metoda sekvenciranja DNK zahvaljujući razvoju tehnologije koja se temelji na visokopropusnim metodama (engl. *high throughput*), koje obuhvaćaju tehnologiju

pirosekvenciranja (454), sekvenciranja sintezom (Illumina) te ligacijsko sekvenciranje,

- treća generacija metoda sekvenciranja DNK uslijedila je zahvaljujući razvoju znanosti i tehnologije koja omogućuje sekvenciranje u stvarnom vremenu (engl. *Real Time Sequencing*) koja uključuje monomolekularno sekvenciranje u stvarnom vremenu (engl. *Single Molecule Real Time Sequencing*, SMRT) i sekvenciranje pomoću nanopora.

Trenutačno su prihvaćeni kriteriji da sekvenciranje pojedinačnih molekula, sekvenciranje u stvarnom vremenu i, jednostavno, odstupanja od prethodnih tehnologija trebaju biti temeljna obilježja treće generacije. Vode se znatne rasprave o tome što definira različite metode novih generacija sekvenciranja, osobito u vezi s tehnologijom podjela s druge na treću (Schadt i sur., 2010., Niedringhaus i sur., 2011., Pareek i sur., 2011.).

Tehnologija prve generacije sekvenciranja

Sedamdesetih godina prošlog stoljeća, otkriće i usavršavanje metode sekvenciranja terminacijom sinteze lanca, koju je razvio Frederick Sanger, uvelike pridonosi otkrivanju i razumijevanju izgleda ljudskoga genoma (Sanger i sur., 1977.). Metoda sekvenciranja po Sengeru je, dakle, razvijena 1977. godine, temelji se na kontinuiranom zaustavljanju replikacije, korištenjem fluorescentno obilježenih dideoksinukleotida (ddNTPa). U nastaloj smjesi obilježenih DNK različitih duljina, boja biljega određuje vrstu posljednje baze. Sekvenca DNK molekule određuje se elektroforetskim razdvajanjem visoke razlučivosti nastale smjese te određivanjem fluorescentne boje uz pomoć lasera. Metoda zahtijeva puno vremena i prostora te kapilarnu cijev ili gel za određivanje duljine DNK.

Tehnologija druge generacije sekvenciranja

Krajem devedesetih godina počinje se razvijati nova tehnologija koja je činila preduvjet za ostvarivanje druge generacije sekvenciranja, poznate kao pirosekvenciranje (Ronaghi i sur., 1996., Ronaghi i sur., 1998.). Glavna prednost ove metode je sekvenciranje u stvarnom vremenu. Ova metoda je brza, oko 100 puta brža u odnosu na metodu sinteze lanca i potpuno automatizirana (Ronaghi, 2001.). Pirosekvencioniranje je ujedno bilo temelj za razvoj novog pristupa sekvenciranju, koji će se kasnije nazvati sljedećom generacijom sekvenciranja (*Next Generation Sequencing*, NGS). Ta nova generacija sekvenciranja podrazumijeva automatiziran proces masivnog paralelnog sekvenciranja velikog broja baznih parova i primjenu bioinformatičke obrade dobivenih podataka (Zhang i sur., 2011.). Uređaji za sekvenciranje vezani uz NGS različitih proizvođača tehnologije prisutni su na tržištu od 2005. godine i neusporedivo su brži i jeftiniji u odnosu na dotadašnje. Većina metoda sekvenciranja druge generacije prema navodima Ju i sur. (2006.), temelji se na tehnici „sekvenciranja sintezom“ (engl. *sequencing by synthesis*), čiji su začetnici godine 1998. bili S. Balasubramanian i D. Klenerman sa Sveučilišta Cambridge. Sekvenciranje sintezom slično je Sangerovoj metodi sekvenciranja, međutim, koristi modificirane dNTP-ove koji sadrže terminator, a on blokira daljnju polimerizaciju. Tako enzim polimeraza može dodati samo jednu bazu na rastući lanac DNK. Terminator sadrži fluorescentne markere koji se mogu detektirati pomoću kamere. Metoda pirosekvenciranjem (engl. *pyrosequencing*) je metoda druge generacije sekvenciranja DNK koja se temelji na detekciji otpuštenog pirofosfata (PPi) u reakcijama DNK

polimerizacije. Intenzitet emitiranog svjetla daje podatak je li došlo do dodavanja dNTP-a na lanac i koliko dodavanja se dogodilo u ukupnoj reakciji (Ronaghi i sur., 1996.). Ova metoda ima i nedostatke, poput gubitka signala u trenutku ispiranja predložaka, smanjenja enzimске snage, teškoća pri određivanju broja nukleotida zbog nelinerane jakosti svjetla pri većim fragmentima i dr. (Ronaghi i sur., 1996.). Pirosekvenciranje je kasnije licencirano za uređaj 454 Life Sciences (dalje u tekstu 454), a biotehnoška tvrtka koju je osnovao J. Rothburg razvila se u prvu uspješnu komercijalnu tehnologiju „sljedeće generacije sekvenciranja“ (NGS). NGS se koristi za analizu sekundarnih struktura (Nordstrom i sur., 2000.b), analizu mononukleotidnih polimorfizama (Garcia i sur., 2000.), pronalaženje mutacija i sekvenciranje DNK *de novo* kod kratkih lanaca DNK (Nordstrom i sur., 2000.a). Naprednost uređaja za sekvenciranje 454 očitovala se u tome što su dopuštali masu paralelnih reakcija sekvenciranja što je uvelike povećalo količinu DNK koja se može sekvencirati (Margulis i sur., 2005.). Nakon uspjeha tehnologije 454 pojavile su se brojne tehnike paralelnog sekvenciranja. Najvažnije među njima su bile nedvojbeno tehnologija Solexa i kasnije Illumina metode sekvenciranja (Voelkerding i sur., 2009.).

Nekoliko drugih tvrtki koje su osnovane, a u međuvremenu i ugašene, razvijajale su postupke sekvenciranja te imale različit utjecaji na izvedbu i tržište. Druga i treća generacija sekvenciranja kao glavnu opciju (uz 454 i Solexa / Illumina sekvenciranje) (Luo i sur., 2012.) nudile su sekvenciranje ligacijom i detekcijom oligonukleotida (SOLiD), sustav koji je razvila tvrtka Applied Biosystems (koji je kasnije postao tvrtka Life Technologies nakon spajanja s Invitrogenom) (McKernan i sur., 2009.).

Tehnologija treće generacije sekvenciranja

Slijedio je razvoj tehnologije treće generacije sekvenciranja. Smatra se da su tehnologije treće generacije one koje mogu sekvencirati pojedinačne molekule, bez zahtjeva za umnožavanjem DNK zajedničkog svim prethodnim tehnologijama (Heather i Chain, 2016.). Kao što mu ime govori, SOLiD nije sekvenciranje sintezom (tj. kataliziranje s polimerazom), nego ligacijom, uporabom DNK ligaze (Shendure i sur., 2005.). Najčešće korištenom trećom generacijom tehnologije sekvenciranja smatra se SMRT tvrtke Pacific Biosciences (Van Dijk i sur., 2014.). SMRT je metoda treće generacije sekvenciranja DNK. Rabi tehnologiju „vodiča vala u nultom-modu“ (engl. *zero-mode waveguide*, ZMW). To je optički nanouređaj koji provodi elektromagnetske valove u optički spektar.

Metoda koja se ubraja u treću generaciju je sekvenciranje DNK pomoću nanopora. Metoda ne rabi ni PCR, kao ni kemijsko označavanje fluorescentnim bojama kao prije spomenute metode. Omogućuje identifikaciju genotipa i mobilnost pri testiranju u stvarnom vremenu. Prolaskom molekula kroz nanopore na površini se stvaraju naboji koji su zaslužni za detektiranje sekvenci (Purnell i sur., 2008., Raza i Ameen, 2017.). Oxford Nanopore Technologies (ONT) je prva tvrtka koja je tržištu ponudila nanopore sekvencer (Clarke, i sur., 2009., Eisenstein, 2012.). Posljednji ponuđen je mobilan, veličine USB-a, a prvi je put bio dostupan krajnjim korisnicima u ranoj, probnoj verziji 2014. godine (Loman i Quinlan, 2014.). Uređaj MinION tvrtke Oxford Nanopore Technologies prvi je prijenosni DNK sekvencer. Malen je, cjenovno dostupan, brzo očitava rezultate i pitom je prilično precizan što omogućuje njegovu primjenu u različitim istraživanjima pa

i u dekodiranju cjelokupnog ljudskog genoma (Jain i sur., 2018.). Tvrtka Oxford Nanopore Technologies razvila je moguće sekvenciranje pomoću procesnih enzima koji povezuju dva sloja membrane i uzrokuju lizu DNK. Biološke nanopore ugrađene u sintetičku membranu odjeljuju provodljive otopine u kojima se nalaze elektrode zbog kojih postoji stalan protok iona kroz pore. DNK lanac (niz nukleotida DNK lanca) iz otopina može se provesti kroz biološke nanopore, a strukturalni elementi molekula određuju se kao promjene u protoku iona. Pojedina vrsta nukleotida prolazanjem kroz poru uzrokuje svojstvenu promjenu protoka, što dopušta precizno određivanje slijeda niza nukleotida u istraživanoj DNK (Clarke i sur., 2009.).

Razvojem nove generacije sekvenciranja cijena samog postupka sekvenciranja ubrzano opada, međutim, ostaju visoki prateći troškovi. U njih se ubrajaju skladištenje i čuvanje podataka o sekvenciranim genomima budući da sekvenciranjem dobivamo velike količine podataka u kratko vrijeme, bioinformatička analiza podataka, interpretacija rezultata, i sve to značajno nadmašuje cijenu samog sekvenciranja (Pinxten i Howard, 2014.). Tako se novo bioinformatika, kao novo znanstveno područje može definirati kao primjena informatike, matematike i inženjerstva u proučavanju bioloških podataka (Luscombe i sur., 2001.). Definiraju je tri cilja: (1) organizirati podatke tako da istraživačima bude omogućen pristup novim podacima, (2) razvoj alata i sredstava za analizu podataka, i (3) korištenje alata za analizu i tumačenje značajno za biologiju (Temmam i sur., 2014.). Primjenom NGS dobiva se velik broj podataka (milijuni sekvenci), a osnovni izazov u primjeni te metode nalazi se u pravilnoj obradi i interpretaciji dobivenih podataka. Dva su osnovna pristupa u analizi sekvenci: mapiranje (usporedba) s poznatim genomima određenih patogena pohranjenih

u različitim bazama podataka ili *de novo* sastavljanje genoma iz sekvenciranih podataka te njihova identifikacija (Vončina, 2017.). Brzi razvoj i relativno niska cijena ipak su omogućili uporabu NGS u temeljnim znanstvenim područjima (istraživanja genske raznolikosti, funkcionalne genomike i evolucijske biologije), veterinarskoj medicini, agrogenomici (stočarstvo, ratarstvo), medicini, stomatologiji, farmakogenomici/terapeutici i forenzici. Sekvenciranje sada osnažuje kliničku dijagnostiku i druge aspekte medicinske skrbi, uključujući rizik od bolesti, terapijsku identifikaciju i prenatalna testiranja (Koboldt i sur., 2013.).

Literatura

- ADAMS, M. D., S. E. CELNIKER, R. A. HOLT et al. (2000): The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287, 2185-2195.
- ALFÖLD, I. J. and K. LINDBLAD-TOH (2013): Comparative genomics as a tool to understand evolution and disease. *Genome Res.* 23, 1063-1068.
- ANDERSON, S., A. T. BANKIER, B. G. BARRELL et al. (1981): Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290, 457-465.
- APARICIO, S., J. CHAPMAN, E. STUPKA et al. (2002): "Whole-genome shotgun assembly and analysis of the genome of *Fugu rubripes*". *Science* 297, 1301-1310.
- ARCHIBALD, A. L., N. E. COCKETT, B. P. DALRYMPLE, et al. (2010): The sheep genome reference sequence: a work in progress. *Anim. Genet.* 41, 449-453.
- BERRY, D. P., M. L. BIRMINGHAM, M. GOOD and S. J. MORE (2011): Genetics of animal health and disease in cattle. *Ir. Vet. J.* 64, 5.
- BIBB, M. J., R. A. VAN ETEN, C. T. WRIGHT, M. W. WALBERG and D. A. CLAYTON (1981): Sequence and gene organization of mouse mitochondrial DNA. *Cell* 26, 167-180.
- BILIĆ, P., J. KULEŠ, A. GALAN, L. GOMES DE PONTES, N. GUILLEMIN, A. HORVATIĆ, A. FESTA SABES, V. MRLJAK and P. D. ECKERSALL (2018): Proteomics in Veterinary Medicine and Animal Science: Neglected Scientific Opportunities with Immediate Impact. *Proteomic* 18, <https://doi.org/10.1002/pmic.201800047>.
- BIRNEY, E., J. A. STAMATOYANNOPOULOS, A. DUTTA et al. (2007): (ENCODE Project Consortium), "Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project". *Nature* 447, 799-816.
- BLATTNER, F. R., G. R. D. PLUNKETT, C. A. BLOCH et al. (1997): The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277, 1453-1462.
- BLAXTER MARK, L. (2004): "The promise of a DNA taxonomy". *Philos Trans. R Soc. Lond. B Biol. Sci.* 359, 669-679.
- BUDIMIR, K., V. MARGETA, G. KRALIK i P. MARGETA (2014): Utjecaj polimorfizma FBP3 i LEPR gena na sadržaj intramuskularne masti u mišićnom tkivu svinja. *Poljoprivreda* 20, 48-53.
- CECILIANI, F., D. ECKERSALL, R. BURCHMORE and C. LECCHI (2014): Proteomics in veterinary medicine: applications and trends in disease pathogenesis and diagnostics. *Vet. Pathol.* 51, 351-362.
- CLARKE, J., H. C. WU, L. JAYASINGHE and A. PATEL (2009): Continuous base identification for single-molecule nanopore DNA sequencing. *Nat. Nanotechnol.* 4, 265-270.
- CRNJAC, J., P. OZRETIĆ, S. MERKAŠ, M. RATKO, M. LOZANČIĆ, S. ROŽIĆ, D. ŠPOLJARIĆ, M. KOROLJKA, M. POPOVIĆ and G. MRŠIĆ (2016): Analysis of 12 X-chromosomal markers in the population of central Croatia. *Legal Med.* 21, 77-84.
- De MIGUEL, N., G. LUSTIG, O. TWU, A. CHATTOPADHYAY, J. A. WOHLSCHLEGEL and P. J. JOHNSON (2010): Proteome analysis of the surface of *Trichomonas vaginalis* reveals novel proteins and strain-dependent differential expression. *Mol. Cell Proteomics* 9, 1554-1566.
- DUNISŁAWSKA, A., A. SLAWINSKA, J. ŁACHMAŃSKA and M. SIWEK (2017): Next generation sequencing in animal science - A review. *Anim. Sci. Pap. Rep.* 35, 205-224.
- EISENSTEIN, M. (2012): Oxford nanopore announcement sets sequencing sector abuzz. *Nat. Biotechnol.* 30, 295-296.
- EVANS, J. P., B. C. POWELL and J. S. BERG (2017): Finding the rare pathogenic variants in a human genome. *JAMA* 317, 1904-1905.
- FEHNIGER, T. A., T. WYLIE, E. GERMINO et al. (2010): Next-generation sequencing identifies the natural killer cell microRNA transcriptome. *Genome Res.* 20, 1590-1604.
- FLEISCHMANN, R. D., M. D. ADAMS, O. WHITE et al. (1995): Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* 28, 496-512.
- FRASER, C. M., J. D. GOCAYNE, O. WHITE, M. D. ADAMS (1995): The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science* 270, 397-403.
- GALIBERT, F., D. ALEXANDRAKI, A. BAUR et al. (1996): Complete nucleotide sequencing of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome X. *EMBO J.* 15, 2031-2049.
- GARCIA, A. C., A. AHMADIAN, B. GHARIZADEH, J. LUNDEBERG, M. RONAGHI and P. NYRÉN (2000): Mutation detection by pyrosequencing: Sequencing of exons 5-8 of the p53 tumor suppressor gene. *Gene* 253, 249-257.
- GROENEN, M. A. M., A. L. ARCHIBALD, H. UENISHI, et al. (2012): Analyses of pig genomes provide insight into porcine demography and evolution. *Nature* 491, 393-398.
- HEATHER, J. M. and B. CHAIN (2016): The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics* 107, 1-8.
- HEBERT, P. D. N., S. RATNASINGHAM and J. R. DEWAARD (2003a): Barcoding animal life:

- cytochrome oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc. R. Soc. Lond. B* 270, 96-99.
28. HEBERT, P. D. N., A. CYWINSKA and S. L. BALL (2003b): Biological identifications through DNA barcodes, *Proc. R. Soc. Lond. B* 270, 313-321.
 29. HILLIER, L. W., W. MILLER, E. BIRNEY, et al. (2004): Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. *Nature* 432, 695-716.
 30. HIRT, R. P., N. De MIGUEL, S. NAKJANG, D. DESSI, Y. C. LIU, N. DIAZ, P. RAPPELLI, A. ACOSTA-SERRANO, P. L. FIORI and J. C. MOTTRAM (2011): *Trichomonas vaginalis* pathobiology new insights from the genome sequence. *Adv. Parasitol.* 77, 87-140.
 31. HOLT, R. A., G. M. SUBRAMANIAN, A. HALPERN et al. (2002): "The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*". *Science* 298, 129-149.
 32. HOWSON, E. L. A., A. SOLDAN, K. WEBSTER, M. BEER, S. ZIENTARA, S. BELÁK, J. M. SÁNCHEZ-VIZCAÍNO, S. VAN BORM, D. P. KING and V. L. FOWLER (2017): Technological advances in veterinary diagnostics: opportunities to deploy rapid decentralised tests to detect pathogens affecting livestock. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 36, 479-498.
 33. IVANKOVIĆ, A. (2005): Uporaba molekularne genetike u animalnoj proizvodnji. *Stočarstvo* 59, 121-144.
 34. JAIN, M., S. KOREN, J. QUICK et al. (2018): Nanopore sequencing and assembly of a human genome with ultra-long reads. *Nat. Biotechnol.* 36, 338-345.
 35. JEX, A. R., D. T. LITTLEWOOD and R. B. GASSER (2010): Toward next-generation sequencing of mitochondrial genomes-focus on parasitic worms of animals and biotechnological implications. *Biotechnol. Adv.* 28, 151-159.
 36. JU, J., D. H. KIM, L. BI, Q. MENG, X. BAI, Z. LI, X. LI, M. S. MARMA, S. SHI, J. WU, J. R. EDWARDS, A. ROMU and N. J. TURRO (2006): Fourcolor DNA sequencing by synthesis using cleavable fluorescent nucleotide reversible terminators. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 19635-19640.
 37. KOBOLDT, D. C., K. M. STEINBERG, D. E. LARSON, R. K. WILSON and E. R. MARDIS (2013): The next-generation sequencing revolution and its impact on genomics. *Cell* 155, 27-38.
 38. LANDER, E. S. (2011): Initial impact of the sequencing of the human genome. *Nature* 470, 187-197.
 39. LINDBLAD-TOH, K., C. M. WADE, T. S. MIKKELSEN, E. K. KARLSSON, D. B. JAFFE, M. KAMAL et al. (2005): Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature* 438, 803-819.
 40. LINDBLAD-TOH, K., M. GARBER, O. ZUK, M. F. LIN et al. (2011): A high-resolution map of human evolutionary constraint using 29 mammals. *Nature* 478, 476-482.
 41. LOMAN, N. J. and A. R. QUINLAN (2014): Poretools: a toolkit for analyzing nanopore sequence data. *Bioinformatics* 30, 3399-3401.
 42. LUO, D., N. TSEMENTZI, T. KYRPIDES, T. READ and K. T. KONSTANTINIDIS (2012): Direct comparisons of Illumina vs. Roche 454 sequencing technologies on the same microbial community DNA sample. *PLoS One* 7 (2012) e30087 doi: 10.1371/journal.pone.0030087.
 43. LUSCOMBE, N. M., D. GREENBAUM and M. GERSTEIN (2001): What is bioinformatics? A proposed definition and overview of the field. *Methods Inf. Med.* 40, 346-358.
 44. MAKALOWSKI, W. (2001): The human genome structure and organization. *Acta Biochim. Pol.* 48, 587-98.
 45. MARGULIES, M., M. EGHOLM, W. ALTMAN and S. ATTIYA (2005): Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437, 376-380.
 46. MARROQUIN, J. (2007): The Language of God: A Scientific Presents Evidence for Belief by Francis Collins. *Proc. (Bayl Univ Med Cent)* 20, 198-199.
 47. MCKAY, S. D., R. D. SCHNABEL, B. M. MURDOCH et al. (2008): An assessment of population structure in eight breeds of cattle using a whole genome SNP panel. *BMC Genet.* 9, 37.
 48. MCKERNAN, K. J., H. E. PECKHAM, G. L. COSTA et al. (2009): Sequence and structural variation in a human genome uncovered by short-read, massively parallel ligation sequencing using two-base encoding. *Genome Res.* 19 1527-1541.
 49. MORENO SWITT, A. I. and V. TOLEDO (2015): Infectious diseases in the genomic era. *Rev. Chilena Infectol.* 32, 571-576.
 50. MORITZ, C. and C. CICERO (2004): DNA Barcoding: Promise and Pitfalls. *PLoS Biol.* 2, e245, doi:10.1371/journal.pbio.0020354.
 51. MRŠIĆ, G., P. OZRETIĆ, J. CRNJAC, S. MERKAŠ, V. SUKSER, I. RAČIĆ, S. ROŽIĆ, L. BARBARIĆ, M. POPOVIĆ and M. KOROLIJA (2018): Expanded Croatian 12 X-STR loci database with an overview of anomalous profiles. *Forensic Sci. Int.-Gen.* 34, 249-256.
 52. NIEDRINGHAUS, T. P., D. MILANOVA, M. B. KERBY, M. P. SNYDER and A. E. BARRON (2011): Landscape of next-generation sequencing technologies. *Anal. Chem.* 83, 4327-4341.
 53. NORDSTROM, T., M. RONAGHI, L. FORSBERG, U. De FAIRE, R. MORGENSTERN and P. NYRÉN (2000a): Direct analysis of single-nucleotide polymorphism on double-stranded DNA by pyrosequencing. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 31, 107-112.
 54. NORDSTROM, T., K. NOURIZAD, M. RONAGHI and P. NYRÉN (2000b): Method enabling pyrosequencing on double-stranded DNA. *Anal Biochem.* 282, 186-193.
 55. ORLANDO, L., A. GINOLHAC, G. ZHANG et al. (2013): Recalibrating Equus evolution using the genome sequence of an early Middle Pleistocene horse. *Nature* 499, 74-78.
 56. PAREEK, C. S., R. SMOCCZYNSKI and A. TRETYN (2011): Sequencing technologies and genome sequencing. *J. Appl. Genet.* 52, 413-435.
 57. PARK, S. T. and J. KIM (2016): Trends in Next-Generation Sequencing and a New Era for Whole Genome Sequencing. *Int. Neurorol. J.* 20, 76-83.
 58. PINXTEN, W. and H. C. HOWARD (2014): Ethical issues raised by whole genome sequencing. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 28, 269-279.

59. PONTIUS, J. W., J. C. MULLIKIN, D. R. SMITH et al. (2007): Initial sequence and comparative analysis of the cat genome. *Genome Res.* 17, 1675-1689.
60. PRIMORAC, D., S. BUTORAC i M. ADAMOVIĆ (2009): Analiza DNA u sudskoj medicini i njezina primjena u hrvatske kaznenopravnom sustavu. *Hrvatski ljetopis za kazneno pravo i praksu (Zagreb)* 16, 3-26.
61. PURNELL, R., K. MEHTA and J. SCHMIDT (2008): Nucleotide Identification and Orientation Discrimination of DNA Homopolymers Immobilized in a Protein Nanopore. *Nano Letters* 8, 3029-3034.
62. PURTY, R. S. and S. CHATTERJEE (2016): "DNA Barcoding: An Effective Technique in Molecular Taxonomy". *Austin J. Biotechnol. Bioeng.* 3, 1059.
63. RAZA, S. and A. AMEEN (2017): Nano pore Sequencing Technology: A Review. *IJASR* 3, 90-95.
64. ROBERTSON, G., M. HIRST, M. BAINBRIDGE et al. (2007): Genome-wide profiles of STAT1 DNA association using chromatin immunoprecipitation and massively parallel sequencing. *Nat. Methods.* 4, 651-657.
65. RONAGHI, M. (2001): Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Res.* 11, 3-11.
66. RONAGHI, M., M. UHLÉN and P. NYRÉN (1998): A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science* 281, 363-365.
67. RONAGHI, M., S. KARAMOHAMED, B. PETTERSON, M. UHLÉN and P. NYRÉN (1996): Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Anal. Biochem.* 242, 84-89.
68. SANGER, F., S. NICKLEN and A. R. COULSON (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.
69. SCHADT, E. E., S. TURNER and A. KASARSKIS (2010): A window into third-generation sequencing. *Hum. Mol. Genet.* 19, 227-240.
70. SEQUENCING CONSORTIUM (1998): Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* 282, 2012-2018.
71. SHENDURE, J., G. J. PORRECA, N. B. REPPAS, X. LIN, J. P. McCUTCHEON, A. M. ROSENBAUM, M. D. WANG, K. ZHANG, R. D. MITRA and G. M. CHURCH (2005): Accurate multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome. *Science* 309, 1728-1732.
72. TEMMAM, S., B. DAVOUST, J. M. BERENGER, D. RAOULT and C. DESNUES (2014): Viral Metagenomics on Animals as a Tool for the Detection of Zoonoses Prior to Human Infection? *J. Mol. Sci.* 15, 10377-10397.
73. Van BORM, S., S. BELÁK, G. FREIMANIS, A. FUSARO, F. GRANBERG, D. HÖPER, D. P. KING, I. MONNE, R. ORTON and T. ROSSEEL (2015): Next-generation sequencing in veterinary medicine: how can the massive amount of information arising from high-throughput technologies improve diagnosis, control, and management of infectious diseases? *Methods Mol. Biol.* 1247, 415-436.
74. Van DIJK, E. L., H. AUGER, Y. JASZCZYCZYNSKI and C. THERMES (2014): Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends Genet.* 30, 418-426.
75. VENTER, J. C., M. D. ADAMS, E. W. MYERS et al. (2001): The sequence of the human genome. *Science* 291, 1304-1351.
76. VOELKERDING, K. V., S. A. DAMES and J. D. DURTSCHI (2009): Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. *Clin. Chem.* 55, 641-658.
77. VONČINA, D. (2017): "Next generation sequencing" u dijagnostici virusa i viroida vinove loze. 61. seminar biljne zaštite. (Opatija, Hrvatska, 7-10. veljače 2017) Zbornik sažetaka. Opatija (55).
78. WATSON, J. and F. CRICK (1953): Molecular structure of nucleic acids. *Nature* 171, 709-756.
79. ZHANG, J., R. CHIODINI, A. BADR and G. ZHANG (2011): The impact of next-generation sequencing on genomics. *J. Genet. Genomics* 38, 95-109.
80. ZIMIN, A. V., A. L. DELCHER, L. FLOREA et al. (2009): A whole-genome assembly of the domestic cow, *Bos taurus*. *Genome Biol.* 10, 42.

Next-generation sequencing in veterinary medicine - a review: part I

Ksenija VLAHOVIĆ, DVM, PhD, Full Professor, Gordana GREGURIĆ GRAČNER, DVM, PhD, Assistant Professor, Marina PAVLAK, DVM, PhD, Full Professor, Daniel ŠPOLJARIĆ, DVM, PhD, Assistant Professor, Luka PAJURIN, DVM, PhD, Project Assistant at Croatian Science Foundation, Maja POPOVIĆ, DVM, PhD, Full Professor, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, Zagreb, Croatia

The completion of the human genome-sequencing project has enabled significant advances in molecular biology, and also opening new perspectives and opportunities in veterinary medicine. Next-generation sequencing represents significant technological progress that allows for vast improvement in the knowledge of the animal genome and its

widespread use in various fields of veterinary medicine. This paper provides a detailed description of the different methods of next-generation sequencing, listing the advantages and disadvantages of each platform.

Key words: DNA; Animal genomes; Next Generation Sequencing; Molecular genetics; History