

Next generation sequencing

Een revolutie in genomanalyse voor kankerdiagnostiek en infectieziekten

In 2000 werd gelijktijdig in Engeland en Amerika aangekondigd dat de complete genetische code van de mens, het humane genoom, bepaald was. Het genoom bestaat uit het DNA dat in iedere celkern zit en is opgebouwd uit vier bouwstenen (basen). De volgorde van deze basen vormt de volledige blauwdruk voor het maken van alle eiwitten; enzymen en andere fundamentele onderdelen die de cel of bijvoorbeeld ons lichaam nodig heeft. Het menselijk genoom bestaat uit ongeveer drie miljard basenparen (zie kader *DNA sequenzen*). Het vaststellen van deze volgorde was gedaan via een techniek die sequencing heet. Sinds 2000 is deze technologie enorm verbeterd in snelheid en kosten en is het basisgereedschap voor de genomanalyse van tumoren, om betere behandelingsmethoden te ontwikkelen. Ook voor genombepaling van het virus dat COVID-19 veroorzaakt bleek sequencing een krachtige methode. Kennis van die genetische code is van direct belang voor de snelle ontwikkeling van onder andere PCR-testen.

Tweede generatie- of next generation sequencing (NGS)

De bepaling van het eerste humane genoom had jaren geduurd en kostte daarnaast miljarden. Omdat al snel het potentieel van de technologie werd ingezien is er sinds 2000 wereldwijd gewerkt aan snellere en goedkopere sequencingmethoden. Deze tweede generatie (next generation sequencing) methoden kenmerken zich door drie elementen: a) sequencing door synthese, b) klonale vermenigvuldiging en c) massaal parallel sequencen (*massive parallel sequencing*).

Ook voor deze nieuwe sequencingtechnieken geldt dat met zuiver DNA-startmateriaal gewerkt moet worden. De monstervoorbereiding van het DNA en zijn kwaliteit zijn van eminent belang (zie kader *DNA-monstervoorbereiding*).

Sequencing door synthese (SBS)

Om de basevolgorde te bepalen wordt

een enkelvoudige DNA-streng gebruikt, waaraan langs biochemische weg de complementaire tegenstreng wordt gesynthetiseerd in een oplossing waarin die bouwstenen allemaal voorkomen (figuur 2). Bij deze aanpak is elk van de basen C, G A en T voorzien van een eigen kleur door een unieke fluorescerende groep. Deze fluorofoor heeft nog een tweede functie: het zorgt ervoor dat er niet nog een volgende base kan worden gebonden als een gelabelde base is gebonden. Zo wordt er steeds slechts een extra base gebonden. Door nu, na wassen, het fluorescentiesignaal te meten, weten we via de kleur welke van de vier mogelijke basen als laatste ingebouwd is. Vervolgens wordt de fluorofoor verwijderd en kan de reactie opnieuw worden uitgevoerd en de volgende base bepaald worden (figuur 2). Zo wordt stap voor stap uit de opeenvolgend gemeten kleuren de

volgorde van de ingebouwde basen bekend en dus ook die van de complementaire DNA-streng, waarvan men de basevolgorde wilde bepalen.

Klonale vermenigvuldiging

Het grootste probleem van SBS is dat een enkele DNA-streng ook steeds maar één fluorescent molecuul bindt, wat een relatief zwak optisch signaal geeft. Farinelli en collega's ontwikkelden daarom klonale vermenigvuldiging (zie figuur 3). Hierbij wordt de te sequencen DNA-streng op een oppervlak gebonden en vervolgens via PCR (polymerasekettingreactie of *polymerase chain reaction*, zie kader op pagina 13) veelvuldig gekopieerd waarna een cluster van duizenden identieke DNA-moleculen op dat oppervlak ontstaat. Als daarop SBS wordt gedaan, ontstaat door de grote aantallen fluoroforen een veel sterker optisch signaal, dat ook betrouwbaarder te meten is [1].

Zo kunnen in de praktijk baselengten van honderd tot driehonderd basen bepaald worden. Wat deze leeslengte bepaalt, is hoe zuiver het chemieprotocol van het binden van de gelabelde, dus onnatuurlijke, basen werkt. Door fouten in dit proces, bijvoorbeeld het niet binden van een base aan een van de DNA-moleculen in het cluster of het inbouwen van de verkeerde base, raken sommige DNA-moleculen in het cluster uit fase met de rest. Door dit defaseringsprobleem wordt de totale kleur van het cluster, die per stap gemeten wordt, minder puur, bijvoorbeeld iets minder rood. Opeenstapeling van dit soort fouten bepaalt hoeveel stappen men via SBS kan uitvoeren, feitelijk totdat de kleur per stap en daarmee de laatste in dit cluster ingebouwde base niet meer eenduidig te bepalen is.

Massaal parallel sequencen

Tot slot wordt niet één maar een groot aantal klonale sequencingreacties parallel uitgevoerd. Verschillende stukken van een DNA-streng worden vastgezet op een drager en klonaal vermenigvuldigd [2]. Een kleurencamera volgt vervolgens de verschillende clusters waarin de SBS-reacties plaatsvinden. Die camera ziet als het ware een sterrenhemel waarvan de kleurontwikkeling in de verschillende clusters ('sterren') gemeten en geanalyseerd wordt. Jonathan Rothberg en collega's waren in 2005 de eersten die dit lieten zien met hun 454 LifeSciences-sequencer [2]. Inmiddels ligt dit aantal parallele reacties rond de 500 miljoen voor de grotere sequencingssystemen (bijvoorbeeld de Illumina Nextseq 500).

Derde generatie sequencing

Tweede generatie sequencing richtte zich op grootschalige en snelle analyse. In de volgende, derde generatie sequencing verschoof de focus naar *single-molecule sequencing* omdat daarmee langere stukken DNA geanalyseerd kunnen worden, wat belangrijke biologische en klinische informatie geeft. De belangrijkste exponenten van deze aanpak zijn:

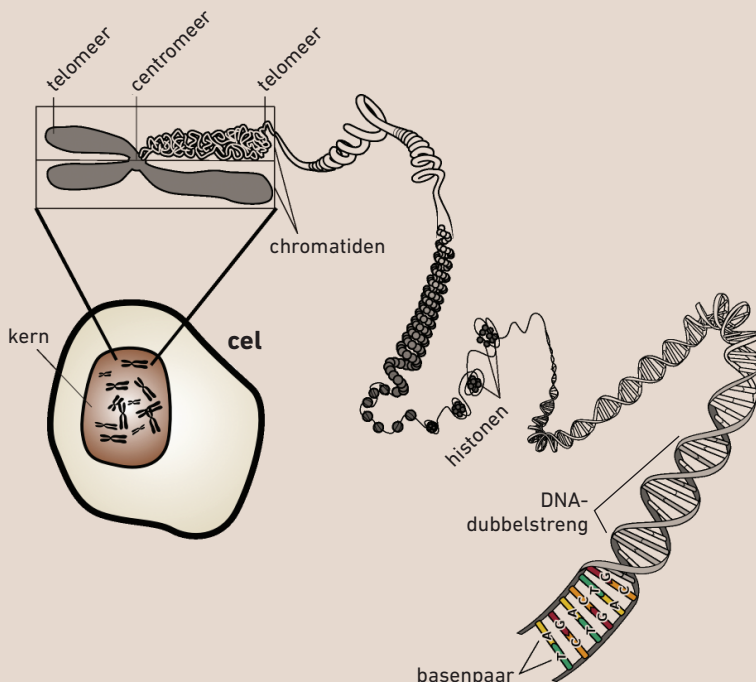
Zero-mode waveguide sequencing (ZMW)

Een *zero-mode waveguide* is een licht-

DNA SEQUENCEN

De celkern van iedere eukaryote cel bevat de genetische informatie van het betrokken organisme in de vorm van DNA (zie figuur 1). DNA is opgebouwd uit vier bouwstenen of basen (guanine (G), adenine (A), cytosine (C) en thymine (T)). Het DNA vormt een dubbelstrengshelix waarin deze basen steeds paarsgewijs voorkomen ($C \leftrightarrow G$, $A \leftrightarrow T$). Als men de volgorde van een van deze ketens heeft, kennen we de ander ook en kunnen die erbij synthetiseren. In de natuur gebeurt dit voortdurend bij de celdeling via het polymerase-enzym.

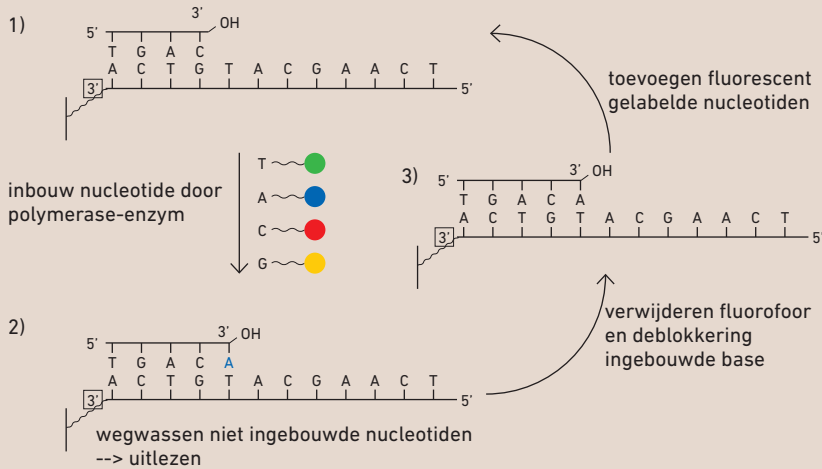
De volgorde van deze basen in het DNA bevat alle informatie, de code, voor de cel om eiwitten te synthetiseren die de cel nodig heeft. Bij het aflezen van die DNA-code wordt messenger-RNA (mRNA) gevormd dat buiten de celkern wordt omgezet in het eiwit waarvoor het codeert. Het bepalen van de basevolgorde van een van de twee DNA-strengen wordt sequencen genoemd. Sequencingtechnieken kunnen ook de basevolgorde van nucleïnezuren als RNA bepalen.



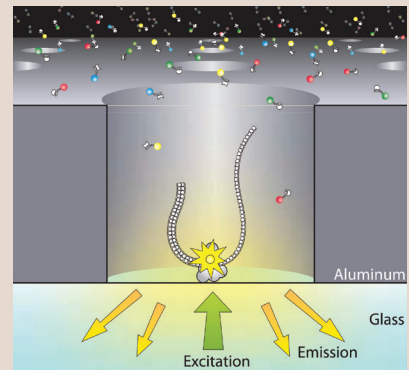
Figuur 1. DNA in de celkern en de structuur van de vier basen waaruit het DNA bestaat en die paarsgewijs voorkomen. Illustratie: National Human Genome Research Institute.

geleider waarin licht niet tot zeer beperkt doordringt. Op de bodem van die golfgeleider wordt het DNA-synthetiserende polymerase-enzym aangebracht, zie figuur 4. Deze vangt een DNA-streng, waarna individuele kleurgecodeerde basen worden toegevoegd. Doordat een DNA-base die wordt ingebouwd iets langer in het detectielicht verblijft dan de vrije basen door pure diffusie, kan bepaald worden welke base wordt ingebouwd [3]. De kracht van deze methode is dat het defaserings-probleem van klonale vermenigvuldiging verdwijnt. Er wordt steeds aan één DNA-molecuul geme-

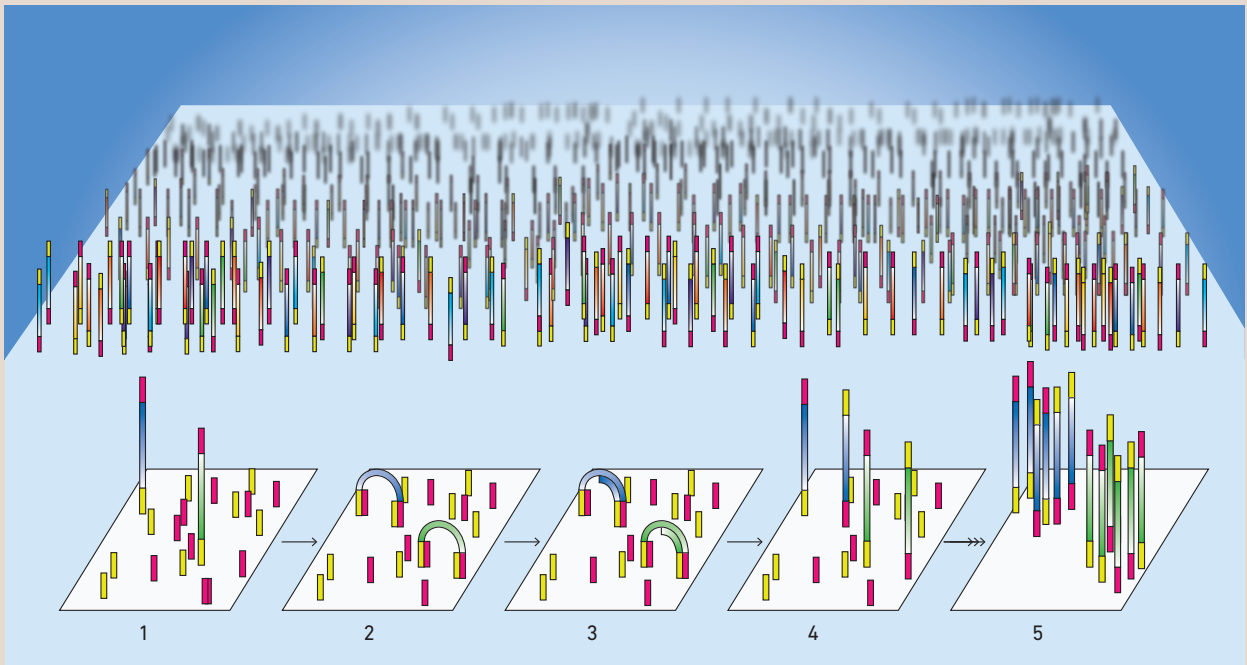
ten, waardoor veel langere leeslengten bereikt kunnen worden, tot wel duizend tot tweeduizend basen. Dit vereenvoudigt het bioinformaticaprobleem om uit de verschillende reads het genoom te bepalen aanzienlijk (zie kader Bioinformatica – basebepaling). Ook kan zo eenvoudiger vastgesteld worden of bepaalde mutaties op dezelfde of op verschillende DNA-strengen zitten, wat biologisch van belang is (bijvoorbeeld bij de HLA-typing van weefsels om afstotingsreacties bij transplantaties te vermijden). Nadeel van de ZMW-aanpak is dat er complexere apparatuur en hoogvermogen lasers nodig zijn.



Figuur 2. Het *sequencing by synthesis*-proces (SBS). Stap 1: aan enkelvoudige DNA-strengen worden de vier verschillende nucleotiden (cytosine, guanine, adenine en thymine) toegevoegd, ieder gelabeld met een specifiek fluorofoor. Het tevens toegevoegde polymerase-enzym, dat DNA synthetiseert, bouwt op het eind van de complementaire streng de eerstvolgende complementaire nucleotide in. Stap 2: na wegwassen van de niet ingebouwde nucleotiden, wordt via het fluorofoorlabel uitgelezen welke base is ingebouwd. Stap 3: het fluorofoorlabel wordt verwijderd waarmee ook de blokkade voor verdere synthese van de complementaire streng wordt opgeheven. Daarmee komt het proces weer bij stap 1 en kan de volgende base bepaald worden.



Figuur 4. Zero-mode waveguide (ZMW). Op de bodem hiervan zit een polymerase-enzym vast, dat gelabelde nucleotiden inbouwt aan een ingevangen DNA-streng. Omdat het excitatielicht zeer beperkt doordringt in de ZMW, kan specifiek het inbouwen van fluorescent gelabelde nucleotiden aan de DNA-streng worden gevolgd, omdat emissie van de onderkant van de ZMW komt waar de polymerase-DNA-combinatie zit en niet van de bovenkant waar de verschillende gelabelde nucleotiden ronddrijven. Doordat na inbouw het fluorescente signaal iets langer duurt dan dat van vrije gelabelde nucleotiden die het excitatievolume binnendrijven, kan onderscheid gemaakt worden tussen wel of geen inbouw. Illustratie: Science.



Figuur 3. Klonale vermenigvuldiging op een oppervlak, zoals gebruikt in de Illumina-sequencingmethode. (Van links naar rechts): 1. DNA-fragmenten voorzien van adapters worden ingevangen op een oppervlak. 2. Het vrije eind buigt zicht naar zijn adaptercomplement (geel-rood). 3. Via een polymerase-enzym wordt het complementaire DNA-streng toegevoegd. 4. Na completering van de streng worden de strengen gedenameerd zodat ze ieder apart op het oppervlak komen te staan (in elkaars buurt). 5. Dit proces wordt een aantal keer herhaald zodat een cluster van identieke DNA-strengen ontstaat op het oppervlak. Op het oppervlak van de cartridge waarin deze reacties lopen gebeurt dit op een groot aantal plaatsen tot miljoenen toe.

Nanoporiensequencing

Waar in de eerder besproken methoden de fysica vooral zat in de gevoelige meting van fluorescentie en de procesbeheersing, is nanoporiensequencing een meer fysische methode. Qua kosten is nanoporiensequencing een zeer aantrekkelijke methode. Het basisidee is dat wanneer een enkelvoudig en negatief geladen DNA-fragment door een potentiaalverschil door een heel klein gaatje of nanoporie wordt getrokken, er op basis van het weerstandsverschil tussen de achtereenvolgens passerende basen kan worden gemeten welke base passeert (figuur 5). Een uitdaging bij het maken van gaten voor nanoporiensequencing is dat het gat in alle richtingen de nanometerschaal moet hebben om het signaal van slecht één base tegelijk te meten. Er zijn twee klassen van nanoporiën die gebruikt worden:

Biologische nanoporiën

Deze methode is het verst ontwikkeld en wordt door het bedrijf Oxford Nanopore Technologies (ONT) commercieel toegepast. De biologische nanoporie is een porie zoals die in ieder celmembraan voorkomt voor transport in en uit cellen. Het signaal dat wordt gemeten is de blokkade van de ionenstroom als een DNA-fragment de nanoporie in het membraan passeert. Elk van de vier basen geeft een iets andere stroommodulatie. Inmiddels is de technologie zo ver dat slechts een enkelvoudig DNA-fragment de porie kan passeren en een dubbelgevouwen streng niet. Daarnaast kan tegenwoordig precies één nanoporie per meetcel worden ingebouwd. In de praktijk bleek controle van de snelheid waarmee de DNA-streng door de nanoporie gaat cruciaal om het leesproces beheersbaar te houden voor nauwkeurige analyse [4]. Oxford Nanopore Technologies heeft daarom voor de strand-sequencing-nanoporie gekozen (figuur 5c) [5]. Belangrijk is dat Oxford Nanopore Technologies de bioinformatica van de genoomassemblage (zie kader Bioinformatica – basebepaling) in realtime, online doet. Zo kan via een eenvoudige chip, zelfs op plaatsen

DNA-MONSTERVORBEREIDING

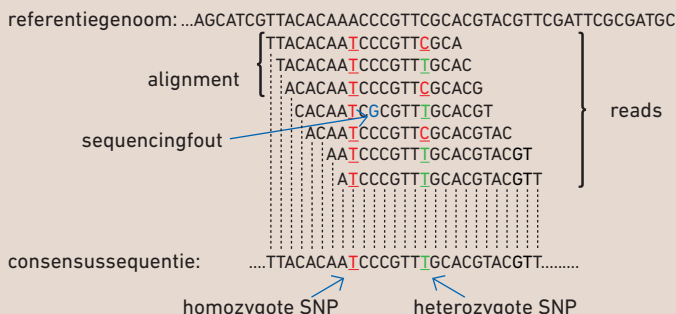
De monstervoorbereiding is belangrijk voor de kwaliteit van het eindresultaat, opdat er geen bias wordt geïntroduceerd. Deze DNA-extractie gebeurt op een standaardmanier, waarna sequencing-specifieke stappen volgen:

1. Omdat iedere cel een beperkte hoeveelheid DNA bevat (een humane cel zes picogram) volgt eerst een vermeerdering van het gehele genoom (*whole genome amplification*). Deze stap moet voor voldoende uitgangsmateriaal zorgen, zonder vertekening door vermenigvuldigingsvoorkeur voor sommige DNA-stukken van de input.
2. Het DNA wordt lukraak gefragmenteerd via ultrasone fragmentatie. Idealiter in stukken die overeenkomen met de leeslengte van de DNA-sequencingstechniek om het inputmateriaal zo efficiënt mogelijk te gebruiken.
3. Omdat ultrasoundfragmentatie tot niet-gelijke einden aan de DNA-fragmenten leidt, moeten deze eerst via een enzymatische reactie gelijk gemaakt worden (vanwege de volgende stap).
4. Ligatie van adaptoren aan de dubbelstrengs-DNA-fragmenten. Deze adaptoren zijn nodig voor de koppeling aan het sequencingoppervlak (zie figuur 3) of om beide strengen aan elkaar te koppelen om zowel de DNA-streng als zijn complement samen te meten voor foutcorrectie (bij ONT-nanoporiensequencing).
5. Daarna volgt DNA-denaturatie via temperatuursbehandeling bij 95 °C, om enkelstrengs-DNA als input voor de sequencingreactie te krijgen.

Tussen deze stappen vinden opzuiveringsbehandelingen plaats om een zo zuiver mogelijk eindproduct te krijgen van het vaak schaarse inputmateriaal.

BIOINFORMATICA – BASEBEPALING

Om vanuit de verschillende stukken gelezen DNA, de zogenoemde *reads*, tot de accurate beschrijving van de DNA-code van een genoom te komen worden die *reads* gezien als verschillende fragmenten van zinnen. Vervolgens wordt met behulp van bioinformatica naar overlap tussen deze fragmenten gezocht, die dan aan elkaar worden gelinkt volgens onderstaand schema.



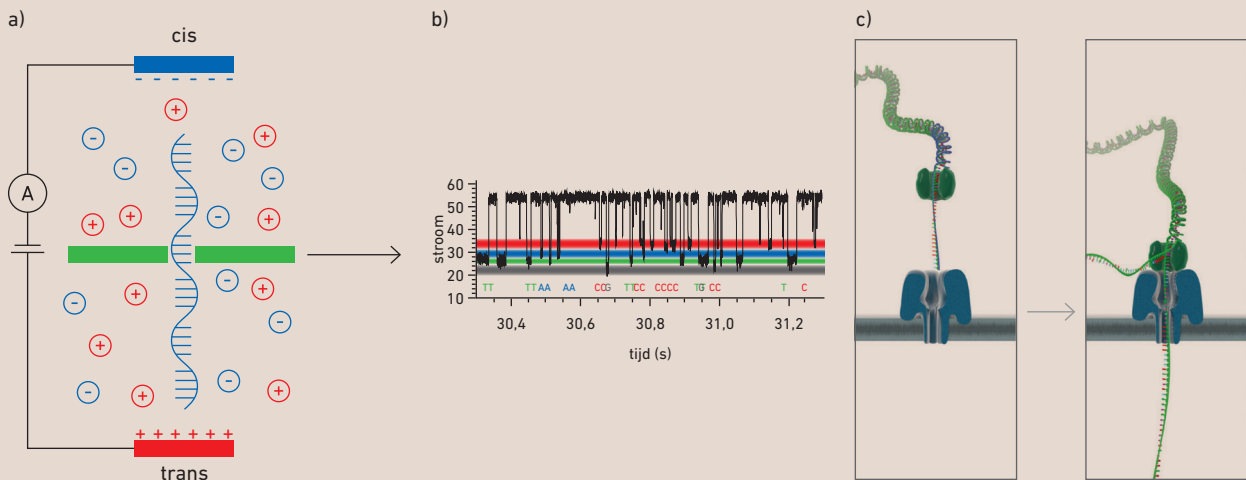
Uit de overlappende stukken 'tekst' wordt de consensus bepaald. Op sommige plaatsen in het genoom wijkt de gevonden code mogelijk af van het referentiegenoom, zie de rood gemarkeerde base in bovenstaand schema. Dit heet een *single-nucleotide polymorphism* (SNP) of puntmutatie. Als deze in bijna 100% van de ter plaatse gelezen base voorkomt, is er sprake van een homozygote SNP. Maar omdat het DNA is samengesteld uit het DNA van twee ouders komen er ook heterozygote SNP's voor waarin de base in 50% van de gevallen afwijkt. Daarnaast bestaan er nog andere afwijkingen van het referentiegenoom, zoals inserties en deleties van stukken DNA, en zogenoemde *copy number variations* (CNV's), waarin een bepaald stuk DNA een aantal maal herhaald wordt.

waar de middelen zeer beperkt zijn, sequencing worden gedaan.

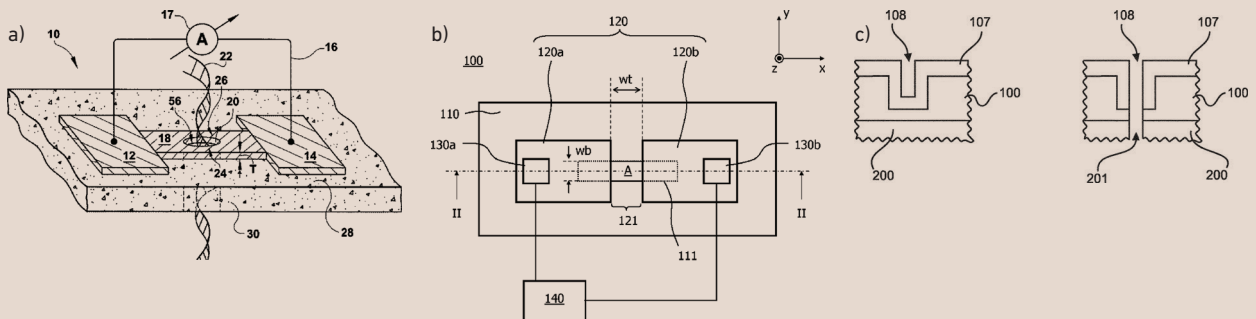
Solid state-nanoporiën

Met chiptechnologie zijn nanoporiën

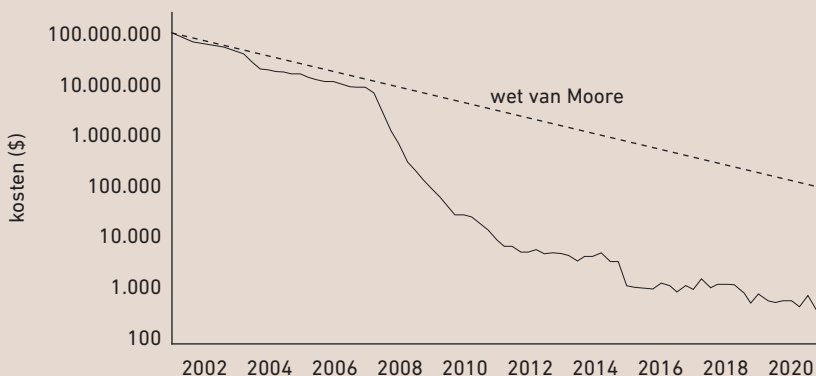
in silicium te maken. Maar de ideale nanoporie is gebaseerd op grafeen. Hierbij wordt niet de blokkade van de ionenstroom gemeten (figuur 5) maar de tunnelstroom. Deze verschilt per



Figuur 5. Schematisch overzicht van het genereren van een signaal bij het passeren van een enkelvoudige DNA-streng door een nanoporie. a) Van de cis- naar de transkamer wordt transport van elektrisch geladen DNA-strengen geïnduceerd door een potentiaalverschil aan te leggen. Als een DNA-streng dan door een nanoporie in het membraan gaat dat beide kamers scheidt, varieert de ionenblokkadestroom. b) De mate van blokkade van deze stroom hangt af van de base in het nanoporiekanaal. Zo kan de basevolgorde bepaald worden. c) De tegenwoordig gebruikte porie voor biologische nanoporiësequencing. Aan het dubbelstrengs-DNA wordt een motoreiwit (groen) gekoppeld dat door het spanningsverschil landt op de nanoporie in het membraan tussen beide kamers, zie 5a. Het motoreiwit opent het dubbelstrengs-DNA en drijft gecontroleerd eerst de ene en daarna de andere streng (gekoppeld in monsterpreparatieproces) met een gecontroleerde snelheid door de nanoporie. Deze nanoporiëstechnologie is de basis van een aantal chips met daarin een oplopend aantal cellen waarin parallelle nanoporie-DNA-sequencing plaatsvindt. Een uitdaging hierbij is om het zwakke nanoporiëdoorvoersignaal in die chip uit te lezen en te versterken. Figuur a): [11], b): [12]. Illustratie c): Image courtesy of Oxford Nanopore Technologies PLC.



Figuur 6. Verschillende grafeennanoporiën met octrooi voor sequenzen. a) De grafeennanoporie die Lieber en collega's hebben voorgesteld in US patent 10,119,955 B2. Omdat hierbij de stroom niet door maar langs de nanoporie zal gaan, is een ander ontwerp nodig. b) In het *cross-slit* nanoporie-ontwerp van Van der Zaag en collega's uit US patent 10,281,453 B2 zorgt een extra spleet van breedte (wt) dat er geen direct geleidingspad is tussen de grafeenelektroden, anders dan via tunneling via een DNA-streng. c) Via atoomlaagdepositie (ALD) is het mogelijk de nanopore nauwe spleten te maken. Dat kan omdat via ALD-conforme bedekking in een voorgeëtste spleet (108) mogelijk is. Via een laagdikte (107) is de vernauwing van de spleet (108) instelbaar. (Verschuuren en Van der Zaag, US patent aanvraag 2021/0165314 A1.)



Figuur 7. De kosten van het sequencen van een menselijk genoom over de laatste twintig jaar, weergegeven met logaritmische schaal op de y-as. Merk op hoe dramatisch de kosten gedaald zijn (zelfs harder dan de wet van Moore die de groei van de kracht van chips aangeeft). Deze enorme daling in kosten heeft allerlei nieuwe toepassingen van sequencing mogelijk gemaakt die nu routinematig kunnen worden gedaan, zoals het sequencen van ziekteverwekkers, bijvoorbeeld SARS-CoV-2. Figuur: National Human Genome Research Institute.

base en geeft meer signaal [6]. Grafeen is hiervoor ideaal omdat het een laagdikte van slechts 3 Å heeft, precies de nucleotide-afstand in DNA, en ook een zeer goede geleider is. Toch is het niet helemaal zo simpel als het eerste octrooi op dit gebied van Lieber en collega's suggereert (figuur 6) [7], en berekening van de vervangingsweerstand direct laat zien. Een wat complexe versie van de grafeennanoporie is nodig om de stroom door de tunneljunctie te leiden, zoals de *cross-slit-nanopori*-device getoond in figuur 6. Ook hier blijft het fundamentele probleem het betrouwbaar en reproduceerbaar maken van een nanoporie. Mogelijk is de fabricage via atoomlaagdepositie (ALD), waarmee door conforme bedekking via een laagdikte een spleetgrootte kan worden ingesteld, zoals getoond in figuur 6c, een optie.

Belangrijkste toepassingen

Door de hiervoor beschreven ontwikkelingen zijn de kosten van sequencing enorm gedaald (figuur 7). Dit heeft allerlei nieuwe toepassingen mogelijk gemaakt. De allereerste toepassing van sequenzen was het bepalen van genomen en het menselijk genoom in het bijzonder. In 2008 werd, zodra het minder dan 1 miljoen dollar kostte, het eerste genoom van één individu, James Watson, bepaald [8]. Ondertussen werden allerlei verrassingen in genomen ontdekt zoals *copynumber*-variaties, *insertions* en *deletions* en *inversies* [9]. Ook blijken de genomen van sommige 'simpele' organismen zoals tarwe complexer dan die van de mens (zestien versus drie miljard baseparen). Inmiddels heeft dit vakgebied over de analyse van genomen zijn eigen naam: *genomica* (*genomics*). Dit in afwijking van de oudere term *genetica*, dat over de klassieke wijze van overerving van eigenschappen gaat. Een bijzondere toepassing van sequencing is op het gebied van de *paleogenomica*. Hier wordt vanuit opgegraven materiaal het genoom van uitgestorven soorten bepaald, zoals van de Neanderthaler, hetgeen tot heel nieuwe inzichten in de evolutie en de migratiepatronen van de mens heeft geleid.

Een belangrijke toepassing van sequencing is kankeronderzoek. Er treden bij kanker allerlei afwijkingen in het DNA op waardoor de celdeling ontregeld wordt. Sequencing is een sleuteltechnologie in het beter begripen van de ontwikkeling van kanker op moleculair niveau: hoe kanker zich ontwikkelt en op welke plaatsen in het moleculair ziekteproces men kan ingrijpen met nieuwe medicijnen. Omdat gebleken is dat tumoren heterogeen zijn, is *single-cell sequencing* ontwikkeld om het DNA van *individuele* cellen te kunnen meten. Zo kan het opkomen van nieuwe klonen binnen tumoren worden gevolgd en begrepen worden hoe en waarom resistentie tegen behandeling met een kankermedicijn ontstaat. Inmiddels worden er ook op sequencing gebaseerde methoden ontwikkeld om op basis van bloed, waarin zich fragmenten van tumor-DNA kunnen bevinden, vroegtijdig kanker op te sporen (onder andere door het bedrijf GRAIL). Tenslotte wordt sequencen gebruikt om de basevolgorde van pathogenen als ebola- en SARS-CoV-2-virussen te bepalen. Zo kon heel snel na de eerste COVID-19-uitbraak het nieuwe coronavirus worden geïdentificeerd [10]. Ook de voortdurende speurtocht naar nieuwe COVID-19-virusvarianten kan snel worden uitgevoerd door wereldwijd monsters van patiënten te sequencen. Kennis van de RNA-opbouw van die varianten maakt het mogelijk snel PCR-tests te ontwikkelen om SARS-CoV-2-besmettingen met die nieuwe variant aan te tonen. Ook wordt het daardoor mogelijk vaccins te ontwikkelen tegen nieuwe varianten. Welke sequencingtechniek wordt ingezet hangt af van de doelstelling. Zo is de ONT-nanoporietechnologie ingezet bij de bestrijding van de ebola-uitbraak van 2014 in West-Afrika, omdat maar beperkte middelen nodig zijn: een chip en laptop. Terwijl het sequencen van SARS-CoV-2 met laboratoriumapparatuur van de tweede generatie gebeurt omdat die in veel laboratoria ruimschoots voorhanden is. Sequencingtechnologie met een lange leeslengte is weer heel geschikt is om ziekteverwekkers te identificeren die in lage concentratie

aanwezig zijn, omdat één read genoeg kan zijn voor eenduidige identificatie.

Conclusie

In een tijdbestek van slechts twintig jaar heeft de sequencingtechnologie zich ontwikkeld tot de belangrijkste methode voor genomica- en kankeronderzoek en snelle analyse van ziekteverwekkers bij pandemieën. Nieuwe onderzoeksgebieden zijn hierbij ontstaan zoals genomica zelf en paleogenomica. Het is een prachtig voorbeeld hoe natuurkundige methoden om basen te meten mede hebben bijgedragen aan een revolutie in kankeronderzoek en diagnostiek. Het gebied van next generatie sequencing lijkt daarmee een Nobelprijs waard.

Pieter Jan van der Zaag werkte van 2007 - 2017 op het Philips NatLab aan verschillende aspecten van *next generation sequencing*. Sinds 2021 werkt hij bij de RUG in een gecombineerde aanstelling tussen het Zernike Instituut en het UMCG aan de natuurkundige aspecten van nieuwe kankerdiagnostiek en -detectie.
p.j.van.der.zaag@rug.nl

REFERENTIES

- 1 D. R. Bentley et al., *Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry*, *Nature* **456**-7218, 53-59 (2008) doi: 10.1038/nature07517.
- 2 M. Margulies et al., *Genome sequencing in microfluidically high-density picolitre reactors*, *Nature* **437**-7057, 376-380 (2005) doi: 10.1038/nature03959.
- 3 J. Eid et al., *Real-Time DNA Sequencing from Single Polymerase Molecules*, *Science* **323**-5910, 133-138 (2009) doi: 10.1126/science.1162986.
- 4 S. McGinn et al., *New technologies for DNA analysis - a review of the READNA Project*, *New Biotechnol.* **33**-3, 311-330 (2016) doi: 10.1016/j.nbt.2015.10.003.
- 5 C.G. Brown en J. Clarke, *Nanopore development at Oxford Nanopore*, *Nat. Biotechnol.* **34**-8, 810-811 (2016) doi: 10.1038/nbt.3622.
- 6 H.W.Ch. Postma, *Rapid Sequencing of Individual DNA Molecules in Graphene Nanogaps*, *Nano Lett.* **10**-2, 420-425 (2010), doi: 10.1021/nl9029237.
- 7 C.M. Lieber et al., *High resolution molecular sensor*, US patent 10,119,955 B2, 6 november 2018.
- 8 D.A. Wheeler et al., *The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing*, *Nature* **452**-7189, 872-876 (2008) doi: 10.1038/nature06884.
- 9 L. Feuk et al., *Structural variation in the human genome*, *Nat. Rev. Genet.* **7**-2, 85-97 (2006) doi: 10.1038/nrg1767.
- 10 N. Zhu et al., *A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019*, *N. Engl. J. Med.* **382**-8, 727-733 (2020) doi: 10.1056/NEJMoa2001017.
- 11 L. Liang et al., *Computational studies of DNA sequencing with solid-state nanopores: key issues and future prospects*, *Front. Chem.* **2**-5 (2014) doi: 10.3389/fchem.2014.00005.
- 12 J. Clarke et al., *Continuous base identification for single-molecule nanopore DNA sequencing*, *Nature Nanotech* **4**, 265-270 (2009).