

Next Generation Sequencing (NGS), A Key Tool to open the Personalized Medicine Era

Sun-Il Kwon

Department of Biomedical Laboratory Science, Daegu Health College, Deagu, 702-722, Korea

Next-Generation Sequencing (NGS) is a term that means post-Sanger sequencing methods with high-throughput sequencing technologies. NGS parallelizes the sequencing process, producing thousands or millions of sequences at once. The latest NGS technologies use even single DNA molecule as a template and measures the DNA sequence directly via measuring electronic signals from the extension or degradation of DNA. NGS is making big impacts on biomedical research, molecular diagnosis and personalized medicine. The hospitals are rapidly adopting the use of NGS to help to patients understand treatment with sequencing data. As NGS equipments are getting smaller and affordable, many hospitals are in the process of setting up NGS platforms. In this review, the progress of NGS technology development and action mechanisms of representative NGS equipments of each generation were discussed. The key technological advances in the commercialized platforms were presented. As NGS platforms are a great concern in the healthcare area, the latest trend in the use of NGS and the prospect of NGS in the future in diagnosis and personalized medicine were also discussed.

Key Words : Personalized Medicine, Next Generation Sequencing, NGS

I. 서론

유전자를 빼놓고 의학을 논할 수 없는 시대가 되었다. 지난 20년간 인류는 유전체 연구에서 거대한 진보를 이룩해내었다. 인간의 32억 염기쌍의 서열정보가 모두 밝혀졌으며 이제 개인의 유전체를 저렴한 비용에 신속하게 밝히는 단계에 진입하였다. 게놈연구의 초기에는 시간과 비용이 천문학적으로 소요되어서 2001년 인간의 게놈 염기서열정보가 최초로 완성되기까지 약 10년의 세월과 3조원의 비용이 소요되었다(Berglund *et al.*, 2011). 이후 염기서열자동화 기술은 무어의 법칙보다 빠른 속도로 발전하여 비용과 시간이 획기

적으로 줄어들었다. 2012년 말 현재 한 인간의 게놈정보를 밝히는데 단 하루의 시간과 약 100만원대 비용 수준까지 접근하였다(Scientific America News, January 10, 2012).

이러한 변화는 차세대염기서열분석기술(next generation sequencing, NGS)의 획기적인 발전에 바탕을 두고 있다. NGS 기술은 저비용으로 개인의 유전정보를 손쉽게 확보해 준다. 접근이 어렵던 개인 유전정보가 활용되는 새로운 환경은 의학계에 커다란 변화를 일으킬 것으로 전망된다. 맞춤의학은 개인의 유전정보를 해독하고 분석하여 개인의 유전적인 특성을 확인하여 유전적인 특성에 따라 질병의 예방하고 치료하는 것이다. 맞춤의학은 약물유전체학적인 요구에 의해서 처방을 내릴 때마다 개인의 특정유전자를 사전에 확인하게 된다(Meyer *et al.*, 2012). NGS는 단일염기다형성(SNP)의 탐색, 후성유전학적인 메틸화 확인, 종양지표유전자 검사, 특정유전자에 대한 변이로서 삽입, 결실, 구조변이 등의 분석에 사용될 수 있다. NGS 기술은 의학계에 맞춤의료 서비스의 기반을 구축해줄 수 있다.

앞으로 우리나라의 주요병원 유전자 검사실에 NGS 기기

Corresponding Author : Sun-Il Kwon, Department of Biomedical Laboratory Science, Daegu Health College, Deagu, 702-722, Korea
Tel: 053-320-1870
E-mail: psikwon@dhc.ac.kr

Received : 26 November 2012
Return for modification : 5 December 2012
Accepted : 14 December 2012

가 도입되어 활용될 전망이다. 맞춤의학의 요구와 맞물려 NGS는 활용도가 높을 것이다. 본고에서는 염기서열 분석기의 발달과정을 세대별로 나누어 기술의 변천 추이를 단계적으로 살펴본다. 고효율의 NGS기술의 등장과정과 단계별 NGS 기기의 원리, 종류, 특성 등 최신정보를 종합적으로 정리하여 잠재적인 사용자의 이해를 돕고자 한다. 또한 앞으로 NGS 기기가 병원의 진단검사영역에 적용될 전망에 대하여 고찰해 본다.

II. Sanger법(chain termination method)

프레더릭 생어(Frederick Sanger)는 현대 단백질체학과 유전체학을 개척한 인물로서 DNA 염기서열분석법을 개발하였다(Sanger *et al.*, 1977). Sanger가 개발한 DNA 염기서열 분석법은 dideoxynucleotide (dd-nucleotide)를 이용하는 chain termination 기술이다.

Sanger의 방법은 매우 간편하고 독성이 적어서 비슷한 시기에 개발된 Maxam-Gilbert 법(Maxam and Gilbert, 1977)을 꺾히고 빠르게 보급되었으며 차후의 다른 방법들도 이 방법에서 변형/발전되었다. 이 기술은 DNA 합성 기작(DNA polymerization)에 기초를 둔다. 서열분석 대상인 DNA의 단일가닥 부위가 주형(template)으로 사용되며 이 주형에 상보적인 짧은 올리고뉴클레오티드가 합성을 개시하기 위한 프라이머(primer)로 사용된다. DNA 중합반응에서 2',3' dideoxynucleoside triphosphate (ddNTPs)가 사용되면 쇠(strand)의 연장이 종료된다. dd-nucleotide는 정상적인 뉴클레오티드의 당인 ribose의 3' 위치에 있는 수산기(-OH)가 H기로 치환되어 있다. 정상적인 DNA합성과정에서 ddNTPs도 DNA 사슬에 결합할 수 있다. 그러나 DNA 사슬로 들어가고 나면 ddNTPs는 당의 3' 위치(다음 뉴클레오티드가 결합해야 할 자리)에 OH기가 없으므로 더 이상 다음 nucleotide가 결합하지 못하여 신장반응이 종결된다.

반응에서는 4가지의 각기 다른 시험관을 사용한다. 각 시험관에는 DNA의 구성성분이 되는 dNTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)가 공통적으로 들어가 있다. 각각의 시험관에는 서로 다른 ddNTP 사슬 종결자(chain terminator)가 들어

있어서 한 시험관에는 ddATP, 다음 시험관에는 ddTTP, 다음 시험관에는 ddGTP, 다음 시험관에는 ddCTP가 소량씩 들어 있다. 나중에 검출을 용이하게 하기 위하여 dNTP 중의 한가지나 또는 primer는 방사능으로 표지가 되어야 한다.

한 예를 들면 G반응 시험관에는 ddGTP가 포함되어 시험관에서 만들어진 각각의 사슬은 ddGTP가 무작위로 결합할 때에 합성이 종결된다. ddGTP는 무작위적으로 G자리에 들어가므로 모든 G자리에 이론적으로 ddGTP가 들어갈 수 있다. 이 반응에서 합성되는 각각의 DNA 사슬은 모든 G지점에서 끝나게 되므로 합성된 사슬의 길이를 보면 G가 존재하는 위치를 알 수 있다.

이와 마찬가지로 A시험관에서는 사슬의 중합은 모든 A지점에서 끝날 수 있으며, T시험관에서는 모든 T지점에서, C시험관에서는 모든 C지점에서 끝나게 되어, 각 시험관마다 일련의 서로 길이가 다른 DNA가 만들어진다. 반응 후 각 시험관에서 DNA를 변성시켜 새로 합성된 다양한 가닥이 주형으로부터 떨어져 나오게 한다. A, T, G, C 각 염기 반응시험관마다 다른 lane에서 전기영동 후, 길이에 따라 분리된 DNA 조각들을 자기방사법(autoradiography)으로 관찰한다. 인접한 A, C, G, T 각 lane에서 위치에 따라 이동한 DNA 조각인 band를 차례로 읽으면 DNA 염기서열을 결정할 수 있다.

III. 자동화 시퀀싱 기술

초기의 Sanger방식은 반응으로 생성된 DNA 조각을 polyacrylamide slab gel에서 전기영동으로 분리하고 방사능으로 읽어내는 과정을 따로 수행해야하기 때문에 조작이 길고 복잡하며 시간과 노동력이 많이 소요되었다. 형광표지를 도입하고(Smith *et al.*, 1986), 모세관 전기영동(Dolnik, 1999)을 결합시켜 반응과 탐색을 부분적으로 자동화시켰다. 번거롭던 전체 염기서열결정과정의 단순화되고 작업속도가 향상되었다.

1. 자동화에 도입된 기술

1) 형광 labeling

최초의 자동화는 염기서열분석 시스템에 형광표지자를 사용함으로써 가능해졌다. 4종의 파장이 서로 다른 형광표지자를 사용함으로써 시퀀싱 반응이 한 튜브에서 이루어지고 전기영동도 한번으로 충분하게 되었다. 표지(labeling)를 위해서 형광물질을 붙인 primer를 사용하거나, 형광물질을 붙인 dd-nucleotide(예, C: blue, A: black, T: green, G: red)를 사용하였다. 주형으로는 단일가닥이나 이중가닥 DNA를 모두 사용할 수 있다. 다른 튜브에서 A, G, C, T 각각의 반응을 시킨 후, 네 시료를 모두 섞어 한 lane에 넣고 전기영동을 한다. 각기 다른 형광물질을 붙인 dd-nucleotide를 사용할 경우 네 가지 반응을 하나의 튜브 내에서 수행하여도 된다. 전기영동을 하면서 한 지점에서 레이저를 조사하여 그 지점을 지나가는 DNA 띠가 발생하는 형광을 직접 측정 기록한다. A, T, G, C는 각기 다른 파장의 형광을 내고 있기 때문에 염기서열의 순서대로 읽으면 된다. 신뢰도가 확보되는 범위 내로 제한하면 한 번에 약 500 염기가 해석될 수 있다(Smith *et al.*, 1986)(Table 1).

2) 모세관 전기영동(capillary electrophoresis)

제작과 조작에 시간이 걸리는 판상(slab) gel 전기영동 대신 매질충전과 시료주입이 자동으로 이루어지고 속도가 빠른 모세관(capillary) gel 전기영동이 도입되면서 조작이 자동화되고 sequencing이 더욱 빨라지게 되었다. 모세관 수가 96개, 384개 등으로 병렬화되면서 점차 늘어나 분석속도가 빨라졌다. Sanger방법에 모세관전기영동을 결합한 형태의 자동화된 ABI Prizm 3700과 같은 기기가 1990년대 보급되기 시작하면서 인간게놈프로젝트의 진행이 빨라졌다 (Table 1).

Table 1. 자동화 시퀀싱 기기에 도입된 기술

도입된 기술	개선 효과
형광표지(기존 Sanger 법에 형광도입)	반응과 서열판독(reading)이 간편화된 자기방사기록법(autoradiography)과정을 없앴
모세관 전기영동	평판젤 전기영동을 대체하여 전기영동 효율 향상

2. 상용화된 자동화 시퀀싱 장비

최초로 상용화된 자동염기서열 분석장치로는 Applied Biosystems사가 1986년 출시한 ABI 373[®]인데 Sanger 방식의 chain termination 원리에 4종의 다른 형광염료를 사용하였다. 나중에 개발되어 세계적으로 가장 널리 보급된 모델 중 하나인 ABI PRISM 3700은 24시간 자동으로 운용되게끔 하였으며 모세관 전기영동을 사용하였다(Applied Biosystems, home page). 초창기 인간 유전체 사업을 진행하는 동안 주로 Sanger 방법을 기반으로 한 시퀀싱 기기가 사용되었다.

염기서열분석기 뿐만 아니라 주변기기도 자동화되게 되어 사람의 손으로 하던 클로닝과 염기서열 결정 작업이 상당부분 자동화되었다. 사람의 수작업을 대체하고 정확도를 높인 로봇기술이 도입되어 클론들을 막에 찍어주는 픽킹 로봇, 각 클론으로부터 재조합 DNA를 뽑아주는 추출로봇, 염기서열 결정 반응액을 대신 만들어주고 전기영동을 해주는 분주로봇 등이 개발되었다(Kong *et al.*, 2012).

Sanger 방법에 기반한 제1세대 자동화 기기는 인간게놈 프로젝트에 많은 공헌을 하였다.

방대한 양의 유전체를 밝히는데 시간과 속도가 중요한 이슈가 됨에 따라 염기서열 결정과 자료처리 기술 개발에 기술혁신이 단계적으로 이루어졌다.

IV. NGS 기술의 개발

현재 차세대시퀀싱기술(next generation sequencing, NGS)이라고 지칭되는 기술은 자동화로는 제2세대 기술에 해당된다. NGS는 이전의 첫 자동화 기기와 구분하고, 이후에 탄생한 Next NGS 기기(차차세대, 혹은 제3세대 NGS라고도 불림)와 따로 구분하기 위하여 불리는 이름이다. 위에서 설명한 초기 자동화기기는 기술적인 진보에도 불구하고 여전히 개인의 유전체를 밝히는데 시간과 비용이 많이 들었다. 이에 따라 개인의 유전체를 저렴한 비용에 sequencing 할 수 있는 획기적인 기술의 개발이 절실하게 필요하였다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 병목이 되고 있는 복잡한 과정을 과감히 없애거나, 시간이 많이 소요되는 과정을 한

꺼번에 대량으로 처리할 수 있는 방법이 시도되었다. NGS 기술은 수십만개의 반응을 동시에 수행하는 multiplexing 능력이 있으며, 적은 양의 sample로도 sequencing을 가능하게 하여 획기적인 진보를 가져왔다. 이로 인하여 next-generation sequencing(NGS) 기술이라는 용어는 이러한 방법을 지칭하는 일반명사가 되었다. NGS 서열분석기에 도입된 기술은 크게 3가지로 나누어 볼 수 있다(Table 2).

Table 2. NGS 기기에 도입된 기술

도입된 기술	개선 효과
클론 증폭(clonal amplification)	라이브러리(library) 구축과정 제거, 클로닝 과정 제거
대량병렬법(massively parallel)	동시에 수십만 개의 클론을 취급하여 효율 향상
바로 읽을 수 있는 새로운 염기 서열결정법 (비 Sanger법) (base/color calling)	모세관 전기영동 과정 제거

주형clone을 얻는 과정을 단순화 하였다. Sanger 법으로 시퀀싱을 하려면 약 500 염기쌍의 길이를 가진 주형 DNA가 필요하다. BAC library를 구축한 후 subcloning을 통해서 짧은 단편을 cloning한 다음 bacteria에서 증폭해야 한다. 새로운 방법은 번거로운 library 구축과 cloning 과정을 모두 없애고 DNA를 바로 적절히 짧은 단편으로 자른 다음 프라이머를 이용하여 PCR로 바로 증폭하여 주형 clone을 얻었다. 이를 clonal amplification이라 부른다. 이렇게 준비된 주형 DNA단편의 염기서열이 결정되면 shotgun 방식으로 전체 유전체의 염기서열을 짜맞추어나간다.

대량병렬(massively parallel)방식을 도입하여 판상으로 배치하였다. 주형 clone은 숫자가 대단히 많아서 이를 따로 준비하면 시간이 많이 소요된다. 주형에서 염기서열신호를 읽어내는 과정도 효율을 떨어뜨리는 심각한 제한요인이 된다. 수십만개의 다른 clone을 대량병렬(massively parallel) 방식으로 처리하면 시간을 획기적으로 단축할 수 있다.

Sanger법을 벗어난 새로운 염기서열 결정 방식인 cyclic sequencing이 도입되었다.

Sanger법으로 처리하면 전기영동을 해야 염기서열 결과를 판독할 수 있다. 번거로운 전기영동 과정을 없애기 위

해서 주형에 반응을 일으킨 다음, 반응에서 나오는 시그널로 각 주형의 서열정보를 바로 읽는 새로운 방법을 개발하였다. Sanger법을 대체하는 염기서열결정법으로는 pyrosequencing 방법, 각기 다른 형광tag을 붙인 A, T, G, C가 중합될 때에 방출되는 형광신호를 읽는 방법, 그리고 중합반응 대신 oligonucleotide ligation으로 신호를 읽는 방법 등이 있다.

1. NGS에 사용된 기술

NGS가 개발되는데 사용된 중심적인 기술 세 가지를 자세히 살펴보면 다음과 같다.

- 1) 단순화된 주형 clone 얻기(클론증폭(clonal amplification))
- (1) 에멀전 PCR(Emulsion PCR, 유탁액 PCR)

이 방법은 Roche사의 GS FLX와 Life Technology사의 SOLiD 5500시리즈에 사용되었다. 에멀전 PCR은 게놈 DNA를 단편화(fragmentation)하여 얻은 집합체인 DNA library를 기름 속에서 작은 수용액 방울로 공간적으로 잘 분리(separation)한 다음 이 각각의 DNA 단편을 유탁액(emulsion) 안에서 증폭하게 함으로써 각각의 단일 단편(single fragment)에 대한 클론증폭(clonal amplification)을 한다. 기름성분을 계속 저으면서 PCR 시약, 한쪽 PCR primer가 표면에 수식된 미세비드(microbead), DNA library 등이 포함된 수용액상을 한 방울씩 떨어뜨려준다. 그렇게 하여 만들어진 유중수적형 에멀전(water-in-oil emulsion)은 단일 DNA단편, 단일 microbead 그리고 PCR 시약을 함유하게 된다. 열사이클(thermocycling)을 시행하면 이 에멀전 내에서 단일DNA단편은 PCR로 증폭된다(Kelly *et al.*, 2007). 미세비드에는 한쪽 primer가 고정되어있기 때문에 증폭이 됨에 따라 증폭된 DNA단편이 미세비드의 표면에 잔뜩 붙게 된다. 이때 하나의 미세비드에는 단하나의 단일DNA단편에서 유래한 DNA만 붙어있게 된다. 이렇게 증폭된 signal을 포함한 미세비드들은 미세가공한 well이나 sequencing을 위한 기관 위에 공간적으로 잘 구분하여 고정시킨 다음 이어지는 염기서열 결정 반응을 수행한다(정과 신, 2008; Roche, 454 home page, 2012).

(2) Bridge amplification

Illumina사의 Genome Analyzer의 경우 유전체 DNA에서 얻은 짧게 단편화 DNA에 adaptor oligonucleotide를 연결시킨 후, 이를 glass flow cell의 표면에 흘려주면 표면에 고정된 primer (adaptor sequence와 상보적)에 혼성화된다. 이 상태에서 PCR 시약을 가하고 열사이클을 행하면 주변의 표면에 존재하는 free primer에 고정된 DNA가 구부러지면서 다른 쪽의 adaptor가 결합하여 증폭이 된다. 희석을 적절히 잘하면 단일DNA 단편이 공간적으로 분리가 잘 되어 최초 하나의 DNA 단편에서 유래된 cluster가 형성된다. 이 cluster는 하나의 DNA 단편에서 기원한 동일한 집합체인 clone이며 emulsion amplification에서 미세비드와 같은 역할을 한다. 기판위에 cluster들이 형성되면 다음 단계에서는 adaptor sequence에 특이적인 sequencing primer와 sequencing 용액을 이용하여 cyclic sequencing 과정을 행할 수 있다(정과 신, 2008; Illumina home page, 2012).

2) 대량병렬(massively parallel) sequencing

이 방법은 수십만개의 DNA 단편을 동시에 처리할 수 있기 때문에 대량병렬방법이라고도 부른다. 이 방법은 수십만개의 단일DNA단편(single DNA fragment)을 공간적으로 분리한 다음 그 자리에서(*in situ*) 클론을 바로 증폭(clonal amplification)하거나 염기서열 결정반응을 한다.

Roche사의 GS FLX의 경우 먼저 emulsion PCR로 증폭한 후 기판에 깔아서 대량병렬한다. 즉 emulsion PCR을 통해 단편으로 뒤덮인 미세비드를 미세가공으로 제조한 기판 위에 있는 수많은 picoliter reactor well에 골고루 loading한다. 하나의 reactor에는 하나의 미세비드만 들어가게 well의 반경이 설계되어서 각 well은 독립적인 단일DNA단편 클론을 가진다. 이 well 속에서 각 단편에 대한 염기서열 결정이 다음 단계의 cyclic sequencing으로 이루어진다.

Illumina사의 Genome Analyzer의 경우 기판위에 adaptor와 상보적인 primer를 고정시켜 놓았다. 단일DNA단편을 adaptor와 ligation 시킨 후 이것을 기판위에 충분한 간격을 두고 primer에 혼성화한다. 이 상태에서 bridge amplification이 일어나게 한 후 그 자리에서 다음 과정인 cyclic sequencing이 일어나게 한다. 즉 대량병렬 상태를 갖춘 후

증폭과 염기서열결정이 연이어 일어나게 한다.

Life Technology사의 SOLiD 5500시리즈에서는 emulsion PCR로 증폭된 clone을 유리기판 위에 적절한 간격으로 분리한 다음 염기서열을 결정한다(정과 신, 2008; Pareek *et al.*, 2011).

3) Sanger 방법을 탈피한 서열정보 얻기(Cyclic sequencing)

증폭된 단편을 주형으로 사용하여 서열정보를 얻는다. NGS에서는 Sanger방법에서 탈피하여 작용기전이 다른 새로운 염기서열결정법을 사용한다. 주형에 효소적인 조작용을 가하여 mononucleotide를 하나씩 붙이면서 그때 나오는 signal을 물리화학적으로 검출하는 방법이다. 이것을 반복하여 수행하므로 cyclic sequencing이라 한다. 반응을 위한 주형으로는 클론증폭한 단일DNA단편 clone을 사용한다(Shendure *et al.*, 2008).

Roche사의 454 GS FLX의 경우 염기서열결정방법으로 pyrosequencing을 도입하였다.

Pyrosequencing은 DNA polymerase가 nucleotide monomer를 붙일 때 생성되는 이인산을 빛으로 전환하여 sequence를 읽어내는 기술이다. 반응에서 빛은 single nucleotide의 extension이 이루어졌다는 증거이다. 4가지의 dNTP(A, T, G, C)를 순차적으로 넣어서 반응시키고 씻어내기를 반복하면 중합반응이 될 때 마다 빛을 발산하므로 염기서열을 알아낼 수 있다(Roche, 454 home page, 2012).

Illumina사의 Genome Analyzer HiSeq의 경우 형광 tag DNA 합성법을 사용한다. 네 가지 dNTPs(A, T, G, C)에 각기 다른 형광을 tag하여 새로 합성되어 들어오는 nucleotide를 색깔로 구분하여 염기서열 정보를 읽어 들인다. 다음 단계로 넘어가기 전에 형광 tag는 제거되어야한다(Illumina home page, 2012).

Life Technology사의 SOLiD 5500시리즈에서는 ligation을 이용하는 방법으로 염기서열을 결정한다. 이 기기에서는 일정한 간격을 두고 두 개씩 염기를 읽는다. 이 과정을 반복하기 때문에 염기를 중복하여 읽어서 정확도가 높아진다(정과 신, 2008; 권, 2012; Life Technologies home page, 2012;).

Table 3. 대표적인 NGS 기기의 특징(Pareek et al., 2011)

기기명	454 GS FLX [®]	Genome Analyzer HiSeq [®]	SOLiD [®]
회사명	Roche	Illumina	Life Technology
클론증폭(clonal amplification) 방식	emulsion PCR on bead	solid phase bridge amplification	emulsion PCR on bead
클론(clone)의 공간적 분리	one DNA fragment per bead	one DNA fragment per cluster	one DNA fragment per bead
대량병렬 (massively parallel) 방식	기판 위의 수많은 pico-liter reactor wells 존재, bead 하나씩만 들어감	glass flow cell 기판위에 primer 가 부착됨, 단일DNA단편이 결합된 후 클론증폭	기판 glass slide 위에 bead를 공 유결합
시퀀싱 방식 (base/color calling)	pyro-sequencing	sequencing by synthesis	sequencing by ligation
lead length (bp)	400-500	-100	-50
전체염기서열결정	alignment of short reads	alignment of short reads	alignment of short reads

2. 대표적인 NGS 기기의 특징

위에서 설명한 새로운 NGS 기술이 개발됨에 따라 상업화된 시스템들이 보급되었다. Roche사는 2007년 454 Cooperation사를 합병하고 454 GS 개량형 FLX model sequencer (454 Life Sciences home page)를 출시하였다. Illumina사는 2006년 Genome Analyzer HiSeq (Illumina home page)를 출시하였고, Applied Biosystems사는 2007년 SOLiD (Applied Biosystems home page)를 차례로 출시하였다(Table 3). 세 가지의 platform은 공통적으로 복잡한 library 구축과 클로닝과정을 과감히 버리고 클론증폭기술을 채택하였고, 한꺼번에 대량으로 처리할 수 있는 대량병렬방식(massively parallel sequencing) 기술을 택하였으며, cyclic sequencing을 통한 합성신호읽기(sequencing by synthesis)로 염기서열을 결정하여 번잡한 전기영동과정을 버렸다. 모든 기기가 shotgun 방식을 사용하여 읽혀진 짧은 read를 컴퓨터로 배열하여 중복된 부분을 찾아 전체를 완성하는 알고리즘을 사용한다(정과 신, 2008; 권, 2012).

V. Next NGS 시퀀싱

NGS 기기들이 기능과 속도가 많이 향상되었지만 맞춤의 학시대를 열수 있는 실질적인 게놈염기서열결정 비용 목표인 일인당 1000달러에는 많이 못 미친다. 미국국립인간게

놈연구소(National Human Genome Research Institute, NH-GRI)의 연구지원과 여러 기관의 경쟁적인 노력으로 NGS를 뛰어넘는 새로운 원리와 개념의 Next NGS 기기가 개발되고 있다. NGS 다음에 등장하는 새로운 세대의 시퀀싱 기기는 3세대 NGS라고 불리기도 한다. 현재 NGS를 부를 때 1세대 지정이 없이 바로 2세대 NGS, 그리고 그다음은 3세대라는 불려 세대의 구분이 모호하고 혼란을 많이 주고 있다. 그리하여 본고에서는 편의상 NGS 다음에 등장하는 개량형 기기들을 Next NGS라 칭하겠다.

1. Next NGS 기술 (Table 4)

Next NGS에서는 증폭이 없이 단일DNA분자를 사용하여 여러 가지 다양한 방법으로 염기서열을 읽어내는 기술이 도입되었다.

Table 4. Next NGS 기기에 도입된 기술

도입된 기술	개선 효과
단일DNA분자 주형사용	클론 증폭 없애기
염기검출반응으로 합성이나 분해 시 생성되는 다양한 신호 사용 (전류, 빛, 수소이온 등)	검출감도 증대

1) 단일분자 시퀀싱 (증폭 단계 제거)

NGS에서는 시퀀싱 반응에서 CCD카메라로 충분히 잡힐 수준의 광신호를 생성하기 위하여 주형의 수를 충분히 늘

여야 하기 때문에 단일DNA단편으로 먼저 클론증폭을 하였다. Next NGS 기기에서는 이러한 한계를 극복하여 증폭이 없이 단일 DNA분자로부터 바로 시퀀싱을 하게 된다. 즉 DNA를 1 분자 상태로 반응시켜 실시간으로 서열을 읽어낸다. 그리하여 PCR로 하는 클론증폭과정에서 나타날 수 있는 오류와 불균형 증폭문제를 피하여 정확도를 높이고, 전체과정을 1단계 줄여 염기서열결정 속도를 더욱 높이게 되었다(Pareek *et al.*, 2011).

2) 염기탐색방법의 다양화 및 단순화(형광, 막통과 전위 변화, 수소이온탐지)

염기탐색을 위한 반응의 종류도 다양화되었다. 예를 들면 Pacific Biosciences의 SMRT 기술은 DNA 1 분자를 주형으로 삼고 DNA 합성효소로 합성하여 1 염기마다 발생하는 반응을 형광 pulse 변화로 검출하여 실시간으로 염기서열을 결정한다. 그리고 Oxford Nanopore 시퀀서는 외핵산분해효소에 의해 잘려진 하나의 염기가 pore를 통과할 때 발생하는 전위변화로 염기를 읽어낸다(Pareek *et al.*, 2011).

시퀀싱 기술개발의 궁극적인 목표는 증폭이 없이 단일 주형DNA분자를 재료로 사용하고, 합성이나 분해반응을 하면서 생성되는 신호를 전기전자적 신호로 바꾸어서 nucleotide를 순서대로 읽어내는 것이다. 기기는 최대한 단순화하여 소형으로 만들고, 가동비용은 시약값을 줄여서 최소화시키고자 한다.

2. Next NGS 기기의 특징

Heliscope single molecule sequencer는 최초로 단일DNA 분자 시퀀싱을 상용화시킨 기기이며(Heliscos Biosciences home page, 2012) true single molecule sequencing (tSMS) 기술에 의존한다. PCR DNA 증폭 과정을 생략하고 DNA를 1 분자 상태에서 그대로 시퀀싱을 해서 서열을 읽어낸다. 기계적으로 DNA를 절단한 후 polyA 꼬리를 붙인 library를 만들고, 이를 flow cell에 부착한다. 그다음 polyT oligo nucleotide에 혼성화시킨 후, parallel reaction으로 cyclic sequencing한다. 형광nucleotide를 이용한 시퀀싱 방법의 원리는 NGS와 동일하다. 형광을 사용하여 관련 부품과 시약이 필요하고, 이미지를 처리하는 과정에서 오류가 생길 수도 있다(Ozsolac and Milos, 2011; Pareek *et al.*, 2011; 권, 2012).

Pacific Biosciences에서는 단일DNA분자 시퀀싱을 개발하였으며 SMRT(single molecule, real-time) 기술로 불린다. 시퀀싱칩의 바닥에 단 한 분자의 DNA 중합효소가 결합되어있고 이곳에서 주형DNA단편과 시퀀싱 반응을 일으키고 실시간으로 반응을 탐지하여 염기서열을 읽는다. Nucleotide의 인산기 끝에 형광이 부착되어 염기결합반응이 일어나면 형광분자가 탈락하여 형광 pulse가 중단되는데 이 신호변화를 탐지하며 2세대 시퀀서처럼 CCD카메라를 사용한다(Table 5)(Pareek *et al.*, 2011; 권, 2012; Pacific Biosciences home page, 2012).

Table 5. Next NGS 기기의 특징

기기명	SMRT [®]	Oxford Nanopore Sequencing [®]	FRET [®]	Ion PGM [®] Ion Proton [®] sequencer
회사명	Pacific Bioscience	Oxford Nanopore Technologies	Visigen Biotechnology	Iron Torrent
단일DNA분자 방식 여부	yes	yes	yes	no
cyclic sequencing 여부	yes	no	yes	yes
반응 원리	by polymerase	by exonuclease, by nanopore 전류흐름	by polymerase with donor 형광분자	by polymerase
염기서열판독(sequencing detection) 방법	by 형광 pulse	by current	by 형광 방출	by release of hydrogen ion
형광사용여부	yes	no	yes	no

Oxford Nanopore sequencer는 단일DNA분자 시퀀싱 방식이며 NGS의 형광방식을 버리고 전류로 염기신호를 읽는다. 이 Nanopore sensing 기술은 인공적인 관인 nanopore를 사용한다. Nanopore는 전류가 흐르는 통로가 되는데, nucleotide를 nanopore에 통과시키면 전류흐름을 방해하며, A, T, G, C 네 가지 염기의 nucleotide는 각각 다른 전류흐름을 보인다. 이 전위 변화를 이용하여 염기서열을 결정한다. Nanopore는 단백질로 막에 걸쳐서 만드는데 pore를 형성하는 단백질은 자연계에 흔하다. α -hemolysin은 세포막에서 이온과 분자통로 역할을 하는데, 칠량체(heptamer)로 된 protein pore로 내경이 1nm로 DNA 단일분자와 같은 크기이다. 단백질공학으로 조정을 가하면 특정분자(DNA)를 위한 센서(sensor)로 맞추어진다. 단백질 nanopore가 우선 개발되고 있지만 차세대 nanopore로 고체상태(solid-state) nanopore가 개발되고 있다. SiNx나 SiO₂로 만든 합성막에 pore를 만든다. 이온이나 전자빔으로 가공하기 때문에 매우 정교하게 분자구조에 맞출 수 있다. 특이성을 높이기 위해 단백질과 hybrid시킬 수도 있으며, graphene도 좋은 재료 후보가 된다.

염기결정방식은 주형에서 DNA 합성하는 신호를 받는 대신 주형의 nucleotide를 절단하여 유리된 nucleotide의 종류를 읽어내는 exonuclease sequencing방식이다. Nanopore를 가진 α -hemolysin 분자에 exonuclease를 결합시키고 이를 cyclodextrin에 붙였다. exonuclease가 주형에서 nucleotide를 잘라내면 이것이 pore를 통과하면서 전류흐름을 특이적으로 방해하여 각 염기서열을 읽어낸다. Oxford Nanopore sequencer는 PCR 증폭과정과 형광이미지 처리과정 모두를 없앤 혁신적인 초소형의 시퀀서이다. Array chip원리를 이용하기 때문에 high-throughput system이 가능하다 (Table 5)(Nanopore Technology home page, 2012).

Visigen Biotechnologies사의 fluorescent resonance energy transfer (FRET) 기반 기술은 단일DNA분자 시퀀싱 방식이면서 형광 nucleotide를 이용하여 주형에서 DNA를 합성하면서 염기를 읽어낸다. DNA polymerase에 donor 형광 분자를 부착하고 A, T, G, C 각 nucleotide에 서로 다른 파장의 acceptor 형광색소를 수식하였다. Nucleotide가 결합되어 중합될 때 두 형광분자가 접근하게 되어 에너지가

donor 분자에서 acceptor 분자로 이전된다. 이때에 fluorescent resonance energy transfer(FRET)(Selvin, 2000)가 일어나 광신호가 발생하여 염기를 읽을 수 있게 된다(Table 5)(Pareek *et al.*, 2011; 권, 2012).

Ion Torrent사의 반도체 시퀀싱은 Ion Torrent사(Life Technologies사의 자회사)에서 개발한 기술이다. 반도체 칩에서 모든 과정이 이루어지며 칩 속에 well이 고밀도로 집적되어있다. 각기 다른 주형 DNA는 분리된 다른 well에 들어간다. 각 well 바닥에는 ion sensor를 달아 신호변화를 읽는다(Pareek *et al.*, 2011). NGS 기기처럼 먼저 bead에서 PCR로 주형을 증폭하여 각 비즈표면에 주형을 준비한다. Cyclic sequencing 방식을 따라서 A, T, G, C 네 가지 nucleotide를 차례로 넣어 합성반응을 일으킨다. Nucleotide가 DNA에 중합되어 들어갈 때 부산물로 방출되는 수소이온을 전기신호로 포착하여 염기를 읽어낸다. 동일한 염기가 반복되면 그만큼 큰 신호가 잡혀서 구분이 된다. 형광을 사용하지 않으므로 카메라 촬영 과정이 모두 제거되어 장비가 단순해지고 소형화되었다. 형광표식이 필요없게되어서 시약비용도 대폭 경감되었다. PCR DNA 증폭을 여전히 필요로 하는 점에서 NGS와 동일하나, 형광을 제외시켰다는 점에서 높게 평가되는 Next NGS이다(Table 5). 상용화된 제품은 Ion Personal Genome Machine (PGM)이며 이어서 개량형으로 Ion Proton sequencer가 나왔다 시퀀싱 반도체칩 Proton I chip에는well이 1.65억개 있고, Proton II chip에는 well이 6.6억개 있다(Scientific America News, January 10, 2012). Proton II chip을 사용하면 인간 게놈을 2시간 만에 sequencing 하게 된다(Table 5)(Ion-Torrent home page, 2012; 권, 2012).

VI. 유전체 해독기 사용현황

현재 보급되어 사용되고 있는 NGS/Next NGS 개념의 유전체 해독기는 크게 대용량과 소형 두 가지 종류로 볼 수 있다.

1. 대용량 유전체 해독기 현황

현재 차세대 유전체 해독 분야를 이끌고 있는 기기는

NGS 기술에 기반을 둔 HiSeq (Illumina사), SOLiD (Roche사), 454 (Life Technology사)가 대표적이다. 유전체 해독기는 이러한 대형시퀀서를 중심으로 세계적으로 분포되어 있으며 그중 Illumina사의 해독 플랫폼이 가장 많이 보급되었다(Liu *et al.*, 2012). 기존의 강력한 대형 시퀀서는 장비가 고가이며 giga에서 tera급으로 설계되어 있어서 대량으로 수행하는데 적합하다. 대용량 NGS 장비는 상당히 고가이며 장비의 운영과 유지 보수에 많은 비용이 투입되어야 한다. 대용량 NGS인 Illumina사 HiSeq 2000의 경우 기기값이 US\$654,000이며 가동비가 높다. 이들 기기는 주로 상당한 물적/인적 자원을 갖춘 대규모 유전체 센터나 전문적인 시퀀싱서비스 제공업체에서 주로 사용되고 있으며(Quail *et al.*, 2012), 대체로 여러 가지 게놈프로젝트를 수행하는데 중추적인 역할을 하고 있다.

2. 소형 유전체 해독기의 등장과 보급

대용량 NGS 기기는 고가격, 고비용으로 사용자의 부담이 크데, 이를 덜어줄 수 있는 소형의 NGS/Next NGS 기기가 2011년 전후에 등장하였다. 이 장비들은 data 생산량은 대형기기에 비해 낮더라도 적은 비용으로 쉽게 구입할 수 있게 하고, 시퀀싱을 간편하고 빠르게 해준다. 유지 보수와 운영도 간편하여 소규모 연구기관이나 병원에서 사용하기에 적합하여 보급이 늘어나면서 사용자들의 자료가 축적되고 있다.

이러한 개념의 기기로 Roche가 454 기술을 적용한 소형 해독기인 GS Junior를 가장 먼저 내놓았다. 그다음 Ion Torrent사가 Ion PGM를 출시하였다. Ion PGM과 Ion Proton sequencer는 반도체 기술과 수소이온 염기합성신호 검출 방식으로 해독기기 자체가 소형화되어 이러한 요구에 잘 부응한다. Illumina사에서도 자사의 대형 해독기인 HiSeq와 유사한 성능을 가지면서도 8시간 내에 유전체 해독이 가능한 소형기기 MiSeq를 출시하였다. MiSeq는 기기값이 US\$128,000이다. Ion PGM은 장비 본체 US\$50,000, 서버 US\$16,500로 기타 옵션 모두 포함해서 US\$80,000으로 더욱 저렴하다. 운영비용도 1회 장비 가동비용이 상대적으로 낮은 수준이다(Quail *et al.*, 2012).

소형기기의 등장으로 비싸고 어려운 DNA 시퀀싱의 진입

장벽을 낮추어졌다. 2011-2012년에는 유전체 해독기 시장에서 Ion PGM이 가장 많이 보급되었다. 성능측면에서 검증할 하기 위하여 소형 platform인 Ion Torrent의 PGM, Pacific Biosciences의 RS, Illumina의 MiSeq 세 가지 기기를 대용량 기기 중 가장 대표적인 HiSeq와 미생물 게놈을 직접 시퀀싱하면서 비교해보았다. 세 가지 소형기기는 GC-rich, neutral, 경미한 AT-rich 주형의 시료에 대해서는 거의 완벽한 염기서열 정보를 생산하였다. 그러나 극심한 AT-rich 지역에 대해서는 Ion PGM의 경우 결과가 미흡하였으나, 전반적으로 세 기기는 사용가능한 수준의 시퀀싱을 수행하였다(Quail *et al.*, 2012).

VII. 고찰

동일한 질병을 가진 환자들에게 동일한 약을 처방하여도 약물의 효과는 개인 간에 차이가 난다. 이는 개인 간의 유전적인 차이로 인한 것일 가능성이 높다. 맞춤의학이란 이러한 개인의 유전적인 차이에 대한 정보를 바탕으로 환자에 따라 최적의 치료방법을 선택하고 적절한 약물을 사용한다. 이로서 약물의 부작용을 최소화하고 치료의 효율을 극대화하는 것이다.

앞으로 NGS/Next NGS가 진단과 치료 영역으로 들어와 생산되는 시퀀싱 데이터는 임상 진단과 개인 맞춤 의학 연구에 직접적으로 이용되어질 전망이다. 개인 맞춤형 진단은 질병, 체질 등 모든 표현형의 근간이 되는 DNA의 서열 정보를 알아내어 비교함으로써 개인 간의 차이와 질병의 원인을 알아낸다.

환자의 전체 게놈 해독은 연구실을 떠나 병원에서 실제 효과를 거두고 있다. 미국 워싱턴 대학 연구진은 NGS로 백혈병 환자의 게놈을 완전히 해독하여 새로운 유전자 이상을 발견하였다. 환자의 유전자를 고려하여 그에 맞게 맞춤치료를 하여 병세가 호전되었다(Link *et al.*, 2011).

국내에서도 서울대학교병원에서 NGS를 이용하여 한 번의 혈액검사로 듀센형/베커형 근이영양증을 확진하여 보고하였다. 전체 게놈에 대해 NGS로 돌연변이를 조사하여 이상유전자 부위를 찾아 진단한 사례이다(Lim *et al.*, 2011).

경북대학교병원에서는 NGS를 이용하여 유전성 난청 원인 유전자를 검출해내었다. 난청유전자는 밝혀진 것만 60개가 넘는다. 기존의 검출기법으로는 가족력과 많은 가족의 유전정보가 요구되어 가족이 적은 경우에는 적용이 어려웠다. 또 종래의 난청유전자검사는 빈도가 높은 제한된 숫자의 유전자변이만 대상으로 하여 진단효과가 미미하였다. 게놈전체를 조사하는 NGS 기법을 도입함에 따라 모든 난청 유전자를 동시에 분석하여 정확한 진단을 할 수 있게 되었다(Baek *et al.*, 2012).

개인별 맞춤의학 시대를 맞아 유전체 연구의 중요성을 인식하여 국내병원들도 적극적으로 대응하고 있다. 삼성서울 병원은 원내에 조성할 메디컬 클러스터에 삼성유전체연구소(SGI)를 새로 설치한다. 이 유전체연구소는 미국 브로드 연구소(Broad Institute)와 협력해 설립되며, 개인별 맞춤의학 시대에 대비해 유전체 및 맞춤의학 연구를 수행하게 된다(중앙일보 2012.10.11).

앞으로 전개될 맞춤의학 시대에는 NGS/Next NGS가 핵심적인 도구로 자리를 잡게 된다.

2011년에 약 30억 달러 규모를 기록한 세계의 시퀀싱 제품 시장은 2016년에는 66억 달러 규모에 이를 것으로 예측된다. NGS/Next NGS 장비 및 소모품 시장은 연 7.3%로 성장하고, 시퀀싱 서비스 시장은 연 29% 속도로 가파르게 성장하리라 예상된다(BCC Research, 2012 March). 즉 앞으로 NGS/Next NGS 시퀀싱 장비가 병원과 연구소로 넓게 보급되고 서비스가 확대된다고 보는 것이다.

저렴하고 신속한 NGS/Next NGS 기기가 많이 나와서 의료, 임상 분야에서 앞으로 손쉽게 사용할 수 있게 되었다. 특히 소형 NGS/Next NGS는 간편성과 유용성으로 병원에 널리 보급될 가능성이 높다. 특히 Ion Torrent사의 제품은 저렴한 값과 편리함으로 인하여, 대중에게 PC (personal computer)가 공급된 것처럼, 지나치게 고가이었던 NGS 장비를 대중에게 돌려주었다는 평을 받는다. 궁극적으로 저가 소형 NGS 기기는 임상분야로 대이동할 것으로 보인다. 소형 NGS/Next NGS기기 제조업체들도 저변이 넓은 임상적인 적용을 준비하고 있다.

이런 소형 시퀀서들은 인간 게놈의 일부를 부분적으로 밝히는 targeted sequencing이나 미생물의 시퀀싱에도 활용하

기 좋다. 특정질환의 검사나 특정 약물에 대한 부작용을 검사할 경우 유전체 전체를 볼 필요없이 해당되는 일부만 보면 되기 때문에 앞으로 병원에서 진단 목적으로 간편하게 사용하기에 좋다. 병원에서는 일회 검사로 다양한 유전적 소인을 분석하고 그 위험도에 대한 각종 예방적 조치들을 제시할 수 있다. NGS/Next NGS의 활용이 임상검사실로 널리 확대된다면 개인 맞춤의료 시대가 성큼 앞당겨지게 될 것이다.

참고문헌

1. Aborn JH, El-Difrawy SA, Novotny M, Gismondi EA, Lam R, Matsudaira P, *et al.*, A 768-lane microfabricated system for high-throughput DNA sequencing. *Lab Chip*. 2005, 5(6):669-674.
2. Baek JI, Oh SK, Kim DB, Choi SY, Kim UK, Lee KY, Lee SH. Targeted massive parallel sequencing: the effective detection of novel causative mutations associated with hearing loss in small families. *Orphanet J Rare Dis*. 2012, 7:60.
3. BCC Research, 2012 March, DNA sequencing; emerging technologies and applications.
4. Berglund EC, Kiialainen A, Syvänen AC. Next-generation sequencing technologies and applications for human genetic history and forensics. *Investig Genet*. 2011, 2:23.
5. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, *et al.*, The sequence of the human genome. *Science*. 2001, 291(5507):1304-1351.
6. Dolnik V. DNA sequencing by capillary electrophoresis (review). *J Biochem, Biophys, Methods* 1999, 41:103-119
7. Kelly BT, Baret JC, Taly V, Griffiths AD. Miniaturizing chemistry and biology in microdroplets. *Chem Commun (Camb)*. 2007, (18):1773-1788.
8. Kong F, Yuan L, Zheng YF, Chen W. Automatic liquid handling for life science: a critical review of the current state of the art. *J Lab Autom*. 2012, 17(3):169-185.
9. Lim BC, Lee S, Shin JY, Kim JI, Hwang H, Kim KJ, Hwang YS, Seo JS, Chae JH. Genetic diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophy using next-generation sequencing technology: comprehensive mutational search in a single platform. *J Med Genet*. 2011, 48(11):731-736.
10. Link DC, Schuettpeitz LG, Shen D, Wang J, Walter MJ, Kulkarni *et al.*, Identification of a novel TP53 cancer susceptibility mutation through whole-genome sequencing of a patient with therapy-related AML. *JAMA*. 2011, Apr

- 20;305(15):1568–7156.
11. Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, *et al.*, Comparison of next-generation sequencing systems. *J Biomed Biotechnol*. 2012, 2012:251364.
 12. Maxam, A. & Gilbert, W. A new method of sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 1977, 74:560–564.
 13. Meyer UA, Zanger UM, Schwab M. Omics and Drug Response. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2012, Nov 5. [e-pub ahead of reprint]
 14. Pareek CS, Smoczynski R, Tretyn A. Sequencing technologies and genome sequencing. *J Appl Genet*. 2011, 52(4):413–435.
 15. Quail MA, Smith M, Coupland P, Otto TD, Harris SR, Connor TR, *et al.*, A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics*. 2012, 13:341.
 16. Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A.R., “DNA sequencing with chain-terminating inhibitors”, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1977, 74(12): 5463–5467
 17. Selvin PR. The renaissance of fluorescence resonance energy transfer. *Nat Struct Biol*. 2000, 7(9):730–734.
 18. Shendure JA, Porreca GJ, Church GM. Overview of DNA sequencing strategies. *Curr Protoc Mol Biol*. 2008, Jan; Chapter 7: Unit 7.1, Review.
 19. Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RJ, Hughes P, Dodd C, Connell CR, Heiner C, Kent SB, Hood LE., Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* 1986, 321:674–679.
 20. Waddell N. Microarray-based DNA profiling to study genomic aberrations. *Review. IUBMB Life*. 2008, 60(7):437–40.
 21. 권순일, 게놈혁명을 이끄는 고처리량 차세대 유전체 해독기술 (HT-NGS). 한국전문대학교육연구학회 논문집. 제13권 제3.4호. 2012. 11. 30 발간예정
 22. 정규열, 신기원. 차세대 염기서열 분석기술(Next-generation Sequencing Technologies), 신기술. *BT News*. 2008, Winter, 6–12.
 23. 중앙일보 2012년 10월 11일. 삼성서울병원, 2020년, 세계 의학계 이끌 메디컬 클러스터 세운다. http://article.joinsmsn.com/news/article/article.asp?total_id=9555501&cloc=olink|article|default, 2012–11–26 최종방문.
 24. 454 Life Sciences home page: <http://454.com/index.asp>, last visited on 26 Nov. 2012.
 25. Applied Biosystems home page: <http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/applications-technologies/solid-next-generation-sequencing.html>, last visited on 26 Nov. 2012.
 26. Heliscos Biosciences homepage; <http://www.helicosbio.com/Home/tabid/36/Default.aspx>, last visited on 26 Nov. 2012.
 27. Illumina home page: <http://www.illumina.com/>, last visited on 26 Nov. 2012.
 28. Ion-Torrent home page: <https://www.invitrogen.com/site/us/en/home/brands/Ion-Torrent.html>, last visited on 26 Nov. 2012.
 29. Life Technologies home page: <http://www.lifetechnologies.com/kr/ko/home.html>, last visited on 26 Nov. 2012.
 30. Nanopore homepage, <http://www.nanoporetech.com/home>, last visited on 26 Nov. 2012.
 31. National Human Genome Research Institute (NHGRI) home page: <http://www.genome.gov/>, last visited on 26 Nov. 2012.
 32. Pacific Biosciences homepage, <http://www.pacb.com/>, last visited on 26 Nov. 2012.
 33. Roche, 454 home page: <http://454.com/index.asp>, last visited on 26 Nov. 2012.
 34. Scientific America News, 2012, January 10: <http://www.scientificamerican.com/article.cfm?id=1000-genome>, last visited on 26 Nov. 2012.