

Разработка стратегий сборки *de novo* длинных фрагментов ДНК из олигонуклеотидов, синтезированных на микрочипах

Научный руководитель – Семашко Татьяна Александровна

Катичева Анна Эдуардовна

Студент (магистр)

Московский физико-технический институт, Москва, Россия

E-mail: katicheva.ae@phystech.edu

Синтетическая биология — междисциплинарная область науки, объединяющая принципы молекулярной биологии, инженерии и информатики для конструирования биологических систем. Одним из ключевых направлений в данной области является *de novo* синтез ДНК. Современные методы синтеза ДНК уже позволяют воссоздавать вирусные и бактериальные геномы, однако этот процесс остаётся дорогостоящим и трудоёмким. Причины высокой стоимости и низкой производительности при сборке синтетических последовательностей ДНК начинаются с использования олигонуклеотидов, полученных традиционным фосфорамидитным методом синтеза. В данной работе был предложен альтернативный подход к сборке длинных ДНК-фрагментов с использованием олигонуклеотидов, синтезированных на микрочипах, который позволяет значительно снизить затраты и повысить производительность.

Целевая последовательность – фрагмент генома *Mycoplasma gallisepticum* длиной 86780 п. н. – была разбита на блоки размером около 1000 п. н. Олигонуклеотиды для сборки блоков были сгенерированы в программе BAC-browser [1]. На микрочипе было синтезировано 2178 олигонуклеотидов в количестве от атто- до фемтомолей, что недостаточно для реакции сборки. Также, полученные олигонуклеотиды необходимо разделить на группы, которые используются для сборки отдельных фрагментов. Для решения этих задач была использована и оптимизирована методика селективной амплификации пулов олигонуклеотидов методом ПЦР в реальном времени.

Удаление служебных последовательностей олигонуклеотидов проводилось в двух вариантах. Вариант 1 включал последовательные реакции с рестриктазой BseRI, экзонуклеазой λ и смесью ферментов USER, которые приводят к получению пула одноцепочечных олигонуклеотидов для дальнейшей сборки. Для варианта 2 пулы обрабатывались рестриктазами BseRI и BciVI, что приводит к получению пулов двуцепочечных олигонуклеотидов. Дальнейшая двухэтапная ПЦР-сборка оптимизировалась в зависимости от типа олигонуклеотидов. Использование варианта сборки последовательностей ДНК из двуцепочечных олигонуклеотидов позволило получить 2 фрагмента длиной в 1 тыс. п. н.

На следующем этапе работы была показана возможность объединения фрагментов ДНК длиной в 1 тыс. п. н. в более протяжённые последовательности технически простым методом ПЦР, предусматривающим использование тех же реактивов, что и при сборке из олигонуклеотидов. Также были подобраны наиболее оптимальные условия реакции.

Результаты данного исследования свидетельствуют о потенциале метода и целесообразности его дальнейшего совершенствования для эффективной сборки длинных ДНК-фрагментов.

Работа проводилась при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-29-08043) и Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (грант 122030900107-3).

Источники и литература

- 1) Garanina IA, Fisunov GY, Govorun VM. BAC-BROWSER: The Tool for Visualization and Analysis of Prokaryotic Genomes. Front Microbiol. 2018 Nov 21;9:2827. doi: 10.3389/fmicb.2018.02827.