

Совершенствование подходов к химико-ферментативной сборке протяженных двуцепочечных последовательностей ДНК

Научный руководитель – Шевелев Георгий Юрьевич

Переверзев Иван Максимович

Студент (специалист)

Новосибирский государственный университет, Факультет естественных наук,
Новосибирск, Россия

E-mail: pereverzevi1994@mail.ru

Синтез протяженных двуцепочечных ДНК (длиной более 200 - п.о.) имеет большое значение для современной молекулярной биологии и геной инженерии, поскольку позволяет создавать синтетические фрагменты нуклеиновых кислот с заданной последовательностью нуклеотидов без использования матрицы ДНК. Большинство современных способов синтеза протяженных ДНК основаны на использовании коротких синтетических фрагментов ДНК - олигонуклеотидов, полученных с помощью твердофазного амидофосфитного синтеза нуклеиновых кислот. Как правило, последовательность синтезируемой протяженной ДНК разбивается на набор олигонуклеотидов таким образом, чтобы они имели взаимно перекрывающиеся комплементарные концы, которые позволяют таким олигонуклеотидам гибридизоваться между собой в условиях ферментативной реакции элонгации, аналогичных условиям реакции ПЦР, в результате которой синтезируется полноразмерный продукт.

Целью данной работы является разработка подходов к оценке гибридизационных свойств наборов олигонуклеотидов, использующихся для сборки протяженных двуцепочечных фрагментов ДНК, анализ источников ошибок в процессе сборки дцДНК, и поиск способов минимизации числа ошибок.

В ходе работы ген зеленого флуоресцентного белка (GFP, 717 п.о.) был разбит на 16 последовательностей длиной 55 - 60 н.т. Олигонуклеотиды с полученными последовательностями были синтезированы методом твердофазного амидофосфитного синтеза и очищены методом ВЭЖХ-ОФ. Ген GFP был собран методом полимеразной циклической сборки (РСА) и встроен по сайтам рестрикции в плазмиду pUC19. Компетентные клетки DH10B были трансформированы полученной конструкцией методом электропорации. Секвенирование и анализ последовательностей плазмид, выделенных из полученных клонов, позволили установить статистику распределения ошибок и их типов. В результате анализа полученных последовательностей было выявлено, что 74,4% всех ошибок составляют делеции. Также с помощью массового параллельного секвенирования была определена распространенность ошибок непосредственно в синтезированных олигонуклеотидах. Для этого предварительно олигонуклеотиды были попарно достроены фрагментом Клёнова до тупых концов. Был определён процент правильных прочтений и рассчитана вероятность получения полноразмерной геной конструкции без ошибок.