

УДК 577.212.3

СБОРКА И РЕДАКТИРОВАНИЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ**И.А. Владимиров², О.А. Павлова^{2,3}, И.Н. Исаева¹, Д.И. Богомаз^{1,2}.**¹Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого (СПбПУ), Санкт-Петербург, Россия²ООО «Бигль», Санкт-Петербург, Россия³АО «Международный центр репродуктивной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Одним из ключевых методов современной молекулярной биотехнологии, генной инженерии и генетики является сборка генетических конструкций, применяемых затем для целей генной инженерии. Однако часто оказывается, что требуемые фрагменты конструкции невозможно или трудно получить путем амплификации ДНК из природных источников – природный источник последовательности может оказаться труднодоступен, опасен в обращении, последовательность может требовать слишком глубокой модификации, иметь протяженные синтетические вставки или не иметь природных аналогов вообще. В этих случаях последовательность ДНК синтезируется *de novo*.

Поскольку возможности химического синтеза ДНК ограничены по длине, существуют различные методы сборки длинных молекул из коротких синтетических олигонуклеотидов. Очень большой интерес представляет сборка целой последовательности с помощью ПЦР, где в качестве матрицы используется смесь перекрывающихся «черепицей» праймеров. Преимущества технологии очевидны – она относительно проста, может быть реализована с помощью обычных реактивов для ПЦР, используемые олигонуклеотиды не требуют никаких дополнительных модификаций, а их последовательности могут быть подобраны автоматически с помощью специальных программ.

Реальная верхняя граница метода находится где-то в районе 1000 п.н., что все равно ниже, чем потребная длина некоторых элементов генетических конструкций. Другой проблемой является наличие в получаемых молекулах ошибок (это ошибки синтеза и артефакты ПЦР), вероятность наличия которых, начиная с некоторой длины приближается к 100 %, что не позволяет отобрать не содержащий ошибок клон.

Нами предлагается методика сборки готовых последовательностей, позволяющая обойти эти две проблемы с использованием обычных реактивов и оборудования для ПЦР.

Суть метода заключается в том, что последовательность собирается из двух крупных (>500 п.н.) и сильно (>100 п.н) перекрывающихся одноцепочечных фрагментов, которые нарабатываются с помощью асимметричной ПЦР. Асимметричную ПЦР ставили с двадцатикратным избытком наружных праймеров, что приводило к преимущественной амплификации цепочек, которые в итоговой сборке направлены 3' – концом внутрь. При смешивании таких ПЦР-продуктов они комплементарно взаимодействуют перекрывающимися частями и достраиваются полимеразой до полной двухцепочечной матрицы, которую затем в достаточно чистом для клонирования виде получали с помощью ПЦР с фланкирующих праймеров.

Таким образом, фактически можно сращивать друг с другом два фрагмента произвольной последовательности вне зависимости от наличия / отсутствия на них рестрикционных сайтов. Это позволяет решить обе проблемы метода сборки – недостаточную для ряда задач предельную длину и наличие ошибок. В первом случае (когда требуется собрать слишком длинную последовательность) можно произвести сборку из олигонуклеотидов двух более коротких перекрывающихся фрагментов, и затем, после контроля их последовательности, срастить их одноцепочечные копии, наработанные асимметричной ПЦР. Во втором случае (исправление ошибок) можно выбрать клоны, содержащие ошибки в разных частях последовательности, и, амплифицировав «здоровые» части с помощью асимметричной ПЦР, собрать из двух содержащих ошибки клонов один «здоровый».

С помощью данной методики нами были успешно собраны гены длиной более 1200 п.н. Следует заметить, что происхождение последовательности, нарабатываемой с помощью асимметричной ПЦР, не имеет особого значения, что расширяет возможности метода: с помощью него можно сращивать фрагменты, собранные разными способами, пришивать природные последовательности к искусственным.