

Сборка фрагмента генома *Mycoplasma gallisepticum* 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

Микоплазмы - бактерии, имеющие самые маленькие геномы среди самостоятельно реплицирующихся микроорганизмов, выращенных в чистой культуре. Как модельные организмы микоплазмы и другие бактерии класса Молликут представляют особый интерес в вопросах изучения жизненно важных генов бактерий и создания редуцированных геномов.

Синтез целых геномов *de novo* является крайне дорогостоящим, время- и трудозатратным, что обусловлено в основном начальным этапом синтеза - получением олигонуклеотидов. Использование олигонуклеотидов, синтезированных на микрочипах, является возможным альтернативным подходом к синтезу протяженных последовательностей ДНК. В данной работе было предложено использовать олигонуклеотиды, синтезированные на микрочипе, для сборки фрагмента генома *Mycoplasma gallisepticum* длиной в 87 т. п. н.

Смесь из 2178 олигонуклеотидов, синтезированных на микрочипе и имеющих служебные последовательности, при помощи селективной ПЦР-амплификации была разделена на пулы олигонуклеотидов, необходимых для сборки единичных фрагментов ДНК длиной 1 т. п. н. Затем была произведена ферментативная обработка олигонуклеотидов, в результате которой были получены пулы одно- и двухцепочечных олигонуклеотидов.

Был опробован ряд методов сборки фрагментов ДНК из олигонуклеотидов, включая различные вариации ПЦР-сборки, ЛЦР и сборки по Гибсону, в ходе которых были получены 10 фрагментов длиной в 1 т. п. н. Наиболее воспроизводимым оказался вариант двухстадийной ПЦР-сборки из двухцепочечных олигонуклеотидов (63% успешных попыток).

Был произведен анализ количества ошибок в синтезированных последовательностях. Полученные из микрочиповых олигонуклеотидов фрагменты имели $2,7 \pm 1,2$ ошибок на 1 т. п. н., что сопоставимо с числом ошибок при классическом синтезе по нашим ранее опубликованным данным [1].

Также были протестированы вариации объединения фрагментов ДНК длиной в 1 тыс. п. н. в последовательности длиной в 5 тыс. п. н. ПЦР-сборкой, сборкой по Гибсону и *in vivo*. Полученные результаты отражают перспективу использования олигонуклеотидов, синтезированных на микрочипах, для высокопроизводительной сборки протяженных, в т. ч. геномных, последовательностей ДНК.

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) 1. Семашко Т.А. [и др.]. Современные подходы к *de novo* синтезу протяженных фрагментов ДНК: сборка широкого репертуара последовательностей // Acta Naturae. 2024. Т. 16. №1. С. 77-85.