

Zastosowanie bibliotek presyntetyzowanych oligonukleotydów w sekwencjonowaniu DNA

Katarzyna Gromek

W niniejszej pracy podjęto próbę zastosowania techniki indeksacji do sekwencjonowania DNA. Indeksowanie DNA jest metodą polegającą na izolowaniu fragmentów powstałych po cięciu DNA enzymami restrykcyjnymi klasy IIS. Enzymy te charakteryzują się zdolnością do rozpoznawania specyficznej sekwencji w obrębie DNA i cięcia w pewnej, ściśle określonej od niej odległości. W kolejnym kroku procedury fragmenty restrykcyjne są izolowane z zastosowaniem specyficznych indeksów. Takie dwuniciowe adaptory składają się z indywidualnie przygotowywanej nici indeksującej (24-nt) przyłączonej do komplementarnego krótszego oligonukleotydu (20-nt), który jest wspólny dla wszystkich nici indeksujących. Obydwa oligonukleotydy mają odmienne funkcje, podczas gdy krótszy jest używany jako starter w reakcjach amplifikacji i sekwencjonowania DNA, to dłuższy decyduje o specyficzności określonego indeksa względem matrycy – produktu trawienia DNA enzymami restrykcyjnymi klasy IIS. Enzymy stosowane w tej metodzie (np.: AarI, AlwI, BbvI, BbsI, BsaI, BsmAI, BsmBI, BsmFI, BspMI, FokI, SfaNI) trawiąc DNA pozostawiają czteronukleotydowe 5'-lepkie końce. Całkowita liczba wszystkich kombinacji takich końców to 256 (4^4). Dlatego też, biblioteka indeksów składa się z 256 dwuniciowych oligonukleotydów różniących się między sobą 4-nukleotydową sekwencją na końcu 5' nici indeksującej.

W proponowanym przez nas podejściu klonowany do wektora plazmidowego fragment DNA jest substratem w kolejnych reakcjach: (i) amplifikacji (stosowane są do tego startery uniwersalne w stosunku do używanego wektora, np.: M13/pUC); (ii) zautomatyzowanego sekwencjonowania (w pierwszym etapie używa się uniwersalnego startera a w kolejnych krótszej nici indeksa); (iii) komputerowej analizy uzyskanej sekwencji nukleotydowej w kierunku poszukiwania miejsc rozpoznawanych przez enzymy klasy IIS; (iv) częściowego trawienia matrycowego DNA wybranym na podstawie przeprowadzonej analizy enzymem restrykcyjnym klasy IIS; (v) przyłączenia specyficznego indeksa. Cykliczność tych reakcji zapewnia przesuwanie się wzdłuż analizowanego DNA przez przyłączanie w każdym cyklu indeksa o innym lepkiem końcu. Każdemu cyklowi towarzyszy skracanie analizowanej cząsteczki DNA. Efektywność sekwencjonowania DNA przez kroczenie indeksami została z powodzeniem sprawdzona podczas sekwencjonowania plazmidów wyizolowanych z

enteropatogennych szczepów *E. coli* (pEC157, AF432497; pEC904, AY589570; pEC278, AY589571). W tym świetle uprawnione jest stwierdzenie, że opracowana w ramach niniejszej pracy metoda w znacznym stopniu może uprościć zestawianie gotowej sekwencji nukleotydowej przy sekwencjonowaniu dużych odcinków genomowego DNA. Możliwe jest także stosowanie tej metody do zamykania luk pomiędzy kontigami, w końcowym etapie zestawiania sekwencji genomowego DNA. Niewątpliwe zalety tego podejścia to możliwość szybkiego i systematycznego analizowania dowolnej cząsteczki klonowanego DNA przy zastosowaniu biblioteki presyntetyzowanych indeksów (ich całkowita liczba to 256).

Podjęto także próbę zastosowania metody sekwencjonowania DNA przez kroczenie indeksami do analizy większych cząsteczek DNA (10-50 kbp) z pominięciem etapu amplifikacji zindeksowanego fragmentu DNA. Otrzymano czytelne sekwencje zarówno dla DNA faga lambda (wielkość cząsteczki 48,5 kbp) jak i dla pochodnej plazmidu pGEM3Zf(+) (insert 10 kbp). Stwierdzono, iż kluczowe znaczenie ma wybór enzymu do reakcji trawienia DNA.

Zbadano także możliwość zmniejszenia biblioteki indeksów do 64 adaptorów różniących się kohezyjnym końcem 5' poprzez zastosowanie zdegenerowanych nici indeksujących. Testy na specyficzność ligacji zdegenerowanych adaptorów przeprowadzono poprzez analizę klonowanych zindeksowanych fragmentów DNA (badanie pośrednie). Zastosowano także adaptory znakowane izotopowo i matryce DNA o wysokiej czystości, uzyskane przez złączenie dwóch komplementarnych oligonukleotydów oczyszczonych na HPLC (badanie bezpośrednie). Wykazano, iż optymalizacja warunków reakcji ligacji zdegenerowanych adaptorów (podwyższona temperatura reakcji ligacji i wysokie stężenie soli w mieszaninie ligacyjnej) umożliwia specyficzne łączenie z matrycowym DNA. Adaptor zawierający zdegenerowany nukleotyd w pozycji 1 od końca 5' (np. 5'-NATT) wykazuje wysoką specyficzność przyłączenia do matrycy w obecności 100 mM octanu sodu w mieszaninie reakcyjnej.

W ramach niniejszej pracy skonstruowano nowy wektor typu BAC/*oriV*, pKG20 (8694 bp) zawierający dwa miejsca inicjacji replikacji. Pierwsze z nich - *oriS* umożliwia stabilne utrzymywanie w komórkach *E. coli* plazmidów zawierających duże inserty poprzez ograniczenie ilości kopii do maksymalnie dwóch kopii w jednej komórce bakteryjnej, natomiast *oriV* umożliwia uzyskanie znacznych ilości DNA poprzez indukcję L-arabinozą co skutkuje wzrostem liczby kopii plazmidów w komórce. W sekwencji plazmidu występują także dwa miejsca rozpoznawane przez enzym restrykcyjny klasy IIS AarI, które ograniczają obszar zawierający marker genetyczny (gen kodujący endonukleazę restrykcyjną PvuII).

DNA wektora w dużych ilościach można otrzymać ze szczepu niosącego gen metylotransferazy PvuII na chromosomie, gdzie metylowane DNA jest chronione przed cięciem endonukleazą PvuII. Właściwą selekcję klonów przeprowadza się w szczepie pozbawionym genu metylotransferazy PvuII. DNA poddawany analizie jest dzielony mechanicznie na mniejsze fragmenty, łączony z nadmiarem dwuniciowych adaptorów o kohezyjnych końcach 5' komplementarnych względem końców AarI. Tak przygotowane fragmenty DNA są przyłączane do zlinearyzowanego wektora. Po transformacji jedynie komórki bakteryjne zawierające zrekombinowane cząsteczki wektora mogą się namnażać. Tło pochodzące z autoligacji jest minimalne ponieważ replikują się wyłącznie plazmidy pozbawione funkcjonalnego genu dla endonukleazy PvuII. Przeprowadzone testy potwierdziły skuteczność selekcji dla konstrukcji opartej na układzie „toksyna – antytoksyna” (gen restryktazy PvuII – gen metylotransferazy PvuII).