

ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ»

Объект авторского права
УДК 577.213.7

ЩУР
ВЕРОНИКА ВЛАДИМИРОВНА

**РАЗРАБОТКА НОВЫХ ПОДХОДОВ
К ПОЛУЧЕНИЮ СИНТЕТИЧЕСКОЙ ДНК**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия

Минск, 2023

Научная работа выполнена в Государственном научном учреждении «Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси».

Научный руководитель: **Янцевич Алексей Викторович,**
кандидат химических наук, доцент, директор
Института биоорганической химии НАН
Беларуси

Официальные оппоненты: **Шкуматов Владимир Макарович,**
член-корреспондент НАН Беларуси, доктор
биологических наук, профессор кафедры
высокомолекулярных соединений
химического факультета БГУ

Серченя Татьяна Сергеевна,
кандидат химических наук, ведущий научный
сотрудник лаборатории химии белковых
гормонов Института биоорганической химии
НАН Беларуси

Оппонирующая организация: Учреждение образования «Белорусский
государственный технологический
университет»

Защита состоится «22» февраля 2024 г. в 10.00 на заседании совета по защите диссертаций Д 01.21.01 в Государственном научном учреждении «Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси» по адресу: 220084, г. Минск, ул. Академика В.Ф. Купревича, 5/2, зал заседаний Ученого совета, e-mail: tbozhok@iboch.by, тел. +375(29)5697164.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке им. Я. Коласа НАН Беларуси.

Автореферат разослан «18» января 2024 г.

Ученый секретарь совета
по защите диссертаций Д 01.21.01
кандидат химических наук

Т.С. Божок

ВВЕДЕНИЕ

В 21 веке на стыке биоорганической химии и теории сложных систем возникло новое направление – синтетическая биология, целью которого является проектирование и создание биологических систем с заданными свойствами и функциями для решения прикладных задач. Возможности синтетической биологии реализуются в различных областях от создания биофармацевтических лекарственных препаратов нового поколения до хранения цифровых данных в виде ДНК.

Методологическая основа синтетической биологии – химико-ферментативный *de novo* синтез ДНК. Он включает в себя семь основных этапов: разбиение последовательности ДНК на олигонуклеотидные блоки (дизайн), химический фосфорамидитный синтез и подготовка олигонуклеотидов, их ферментативное объединение (сборка) в протяженную ДНК, амплификация, интеграция в плазмидный вектор, скрининг целевых последовательностей и исправление ошибок. Учитывая, что для протяженной молекулы ДНК подобный синтез можно осуществить практически бесконечным количеством способов, значительную роль в обеспечении его эффективности играет рациональное осуществление каждой из стадий.

Настоящая работа посвящена созданию потенциально автоматизируемой, эффективной технологии, позволяющей получать произвольные последовательности ДНК с использованием химико-ферментативного синтеза. Предложены и апробированы новые способы реализации пяти стадий процесса: дизайна, подготовки олигонуклеотидов, синтеза из них ДНК с последующей амплификацией и клонированием продукта сборки в плазмидный вектор.

На сегодняшний день благодаря реализации новых подходов к получению синтетической ДНК, описанных в данной диссертационной работе, синтезирован 41 синтетический ген общей протяженностью 43 644 п.н.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с крупными научными программами (проектами) и темами. Диссертационная работа является частью плановых исследований лаборатории химии белковой инженерии Института биоорганической химии НАН Беларуси, выполненных в рамках Отдельного проекта фундаментальных и прикладных научных исследований НАН Беларуси «Разработка и автоматизация эффективных методов получения синтетических генов», выполнявшегося в 2018-2019 гг. согласно постановлениям Бюро Президиума НАН Беларуси от 15 января 2018 г. № 22 и от 12 марта 2019 г. № 116 (№ гос. рег. 20191477); задания 2.3.4. «Структурный анализ, направленная эволюция и получение рекомбинантных цитохром Р450-зависимых монооксигеназ и ферментов

биосинтеза ДНК для скрининга и метаболической инженерии» подпрограммы «Химические основы процессов жизнедеятельности» (Биооргхимия) государственной программы научных исследований «Химические процессы, реагенты и технологии, биорегуляторы и биооргхимия» на 2021-2025 гг. (№ гос. рег. 20210422); гранта на 2021 г., учрежденного Президиумом НАН Беларуси для поддержки аспирантов, по теме «Разработка новых подходов к получению синтетической ДНК» (№ гос. рег. 20212459).

Тема диссертационной работы соответствует приоритетным направлениям научных исследований Республики Беларусь на 2016-2020 гг. (постановление Совета Министров Республики Беларусь от 12 марта 2015 г. № 190): п. 2 «Химический синтез и продукты»; п. 3 «Биологические системы и технологии» и приоритетным направлениям научной, научно-технической и инновационной деятельности на 2021-2025 годы (Указ Президента Республики Беларусь от 7 мая 2020 г. № 156): п. 2 «Биологические, медицинские, фармацевтические и химические технологии и производства: системная и синтетическая биология».

Цель и задачи исследования. Цель диссертационной работы – разработать эффективную лабораторную технологию химико-ферментативного *de novo* синтеза протяженных молекул двунитевой ДНК, востребованных в биотехнологии и молекулярно-биологических исследованиях.

Поставленные цели достигались выполнением следующих задач:

1. Создать способ получения пулов очищенных олигонуклеотидов для последующего использования в качестве олигонуклеотидных блоков при синтезе днДНК заданной последовательности.

2. Разработать дизайн олигонуклеотидных блоков и способ ферментативного синтеза днДНК, позволяющий увеличить предельную длину синтона при сохранении точности его последовательности.

3. Предложить и испытать новые методы контроля сборки синтетической последовательности ДНК из олигонуклеотидных блоков.

4. Исследовать структуру и предложить механизм образования побочных продуктов ферментативного синтеза днДНК из олигонуклеотидных блоков.

5. Изучить влияние модификации 5'-гидроксильной группы на активность Т4 ДНК-лигазы в реакции лигирования тупых концов с целью создания селективного способа лигирования целевого гена в вектор.

Объектом исследования являлась двунитевая ДНК как продукт химико-ферментативного *de novo* синтеза.

Предмет исследования – ключевые этапы *de novo* синтеза протяженных фрагментов двунитевой ДНК.

Научная новизна:

1. Установлено, что для очистки сложной смеси длинных олигонуклеотидов непосредственно перед сборкой из них днДНК можно

использовать метод твердофазной экстракции с применением наконечников, заполненных сорбентом известной емкости.

2. Показано, что сочетание двух существующих методов сборки днДНК, один из которых позволяет получать весьма протяженные синтоны в небольшом количестве и с многочисленными мутациями, а второй – более короткие днДНК с высоким выходом и небольшим числом мутаций, позволяет увеличить предельную длину синтона в 1,5 раза и получить обогащенный целевой последовательностью продукт.

3. Продемонстрирована возможность с помощью динамического светорассеяния наблюдать в режиме реального времени за объединением олигонуклеотидов в днДНК.

4. Установлена конкатемерная природа высокомолекулярных побочных продуктов сборки днДНК из олигонуклеотидов и предложен механизм их образования.

5. Впервые изучена стабильность в условиях ПЦР олигонуклеотидов с 5'-диметокситритильной защитной группой, показана возможность их объединения в модифицированные по 5'-концам днДНК и продемонстрировано, что данная модификация днДНК препятствует работе ДНК-лигазы.

Положения, выносимые на защиту:

1. Способ получения пулов очищенных олигонуклеотидных блоков для ферментативного синтеза двунитевой ДНК, заключающийся в использовании наконечников дозаторов для твердофазной экстракции с обращенно-фазовым сорбентом с диаметром пор 200 Å, позволяющих проводить одновременное дозирование и очистку олигонуклеотидов для сборки ДНК-синтона.

2. Программируемая ферментативная сборка синтонов, основанная на комбинации двух способов дизайна олигонуклеотидных блоков и специальной температурной программы синтеза, которая позволяет получать обогащенные целевой последовательностью и протяженные (более 1,5 kb) ДНК-синтоны за один этап.

3. Использование методов светорассеяния для контроля процесса ферментативного синтеза днДНК из олигонуклеотидных блоков в режиме реального времени.

4. Механизм образования высокомолекулярных побочных продуктов в процессе сборки ДНК-синтонов, заключающийся в образовании последовательности с идентичными фланкирующими участками в результате некорректного отжига концевых олигонуклеотидов с последующей конкатемерной цепной реакцией.

5. Установление стабильности 5'-диметокситритильной защитной группы олигонуклеотидов в условиях полимеразной цепной реакции и влияния 5'-диметокситритильной защиты на активность Т4 лигазы в реакции

лигирования тупых концов двунитевой ДНК, что позволило предложить способ селективного по отношению к укороченным побочным продуктам лигирования целевых генов в плазмидный вектор.

Личный вклад соискателя. Работы, связанные с проведением ферментативных реакций, синтезом и очисткой олигонуклеотидов, спектрофотометрические, хроматографические, масс-спектрометрические исследования проводились автором самостоятельно. При обсуждении полученных результатов, подготовке научных публикаций соискатель пользовался консультационной помощью главного научного сотрудника лаборатории белковой инженерии Института биоорганической химии НАН Беларуси, члена-корреспондента, доктора химических наук, профессора С.А. Усанова и научного руководителя кандидата химических наук, доцента А.В. Янцевича. Подготовка лабораторных технологических регламентов выполнена в соавторстве с младшим научным сотрудником лаборатории белковой инженерии Ю.П. Буренковой.

Апробация результатов диссертации. Материалы диссертационной работы представлены и доложены на Международных научных конференциях: VI International Conference «Chemistry, Structure and Function of Biomolecules» (Minsk, 22-25 May, 2018); XV международная научная конференция молодых учёных «Молодёжь в науке – 2.0'18» (Минск, 29 окт. – 1 нояб. 2018 г.); 56th Meeting of Serbian Chemical Society (Niš, 7-8 June 2019); VI Международная конференция молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов (Новосибирск, Научоград Кольцово, 22-24 окт. 2019 г.); VII Международная конференция молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов (Новосибирск, Научоград Кольцово, 27-29 окт. 2020 г.); 85-ая научно-техническая конференция профессорско-преподавательского состава, научных сотрудников и аспирантов (с международным участием) «Технология органических веществ» (Минск, 1-13 февр. 2021 г.).

Опубликованность результатов диссертации. По материалам диссертации опубликовано 11 печатных работ, из них 4 статьи в рецензируемых научных журналах (3,97 авторских листа), соответствующих пункту 19 «Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь», тезисы 6 докладов и патент на изобретение.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из содержания, перечня сокращений и обозначений, введения, общей характеристики работы, трех глав, заключения, списка использованных источников и приложения. Работа изложена на 186 страницах, содержит 38 рисунков, 21 таблицу и приложение. Список использованных источников состоит из

библиографического списка, который включает 179 наименований, и 11 публикаций соискателя ученой степени.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Глава 1. Подходы к получению синтетической ДНК (обзор литературы)

Приведены сведения о достижениях и перспективах развития синтетической биологии, в основе которых лежит *de novo* синтез ДНК. Описаны ключевые этапы этого процесса. Обоснован выбор исходных данных для разрабатываемой технологии. Показаны ограничения и возможные способы оптимизации отдельных стадий синтеза ДНК, разработка новых подходов для реализации которых и стала задачей исследования.

Глава 2. Методы исследований

Охарактеризованы реагенты, материалы, оборудование и программное обеспечение, использованные в работе. Приводятся данные о модельных ДНК для экспериментов. Для дизайна сборки ДНК пользовались программой DNAWorks. Для получения олигонуклеотидных блоков использован твердофазный фосфорамидитный синтез, для очистки применяли твердофазную экстракцию (ТФЭ), ВЭЖХ и электрофорез. При работе с синтетической ДНК использованы молекулярно-биологические методы: ПЦР, клонирование, трансформация, выделение плазмидной ДНК, рестрикционный анализ, агарозный электрофорез. Для подтверждения структуры получаемых макромолекул применены ВЭЖХ, масс-спектрометрия (МС), электрофорез, рестрикционный анализ, секвенирование по Сэнгеру, методы динамического и статического светорассеяния (ДРС и СРС).

Глава 3. Новые подходы к получению синтетической ДНК (результаты и обсуждение)

3.1 Очистка пулов олигонуклеотидных блоков

Олигонуклеотиды длиной 40–70 н. перед сборкой синтона обычно очищают индивидуально методом ВЭЖХ или электрофореза в ПААГ. Последний метод упоминается в литературе в связи с очисткой смесей олигонуклеотидов одной длины перед сборкой гена. Оба метода значительно повышают затраты времени и реагентов всей технологии синтеза ДНК.

В работе предложен способ очистки пулов олигонуклеотидных блоков разной длины с помощью метода ТФЭ на обращенно-фазовом (ОФ) сорбенте. Способ позволяет одновременно с очисткой выполнять дозирование смеси, необходимое для проведения одной реакции сборки синтона.

Выдвинуто предположение, что взаимная комплементарность олигонуклеотидных блоков в условиях очистки может приводить к образованию крупных комплексов, для которых затруднено связывание с сорбентом. Для

проверки гипотезы использовали Thermodynamically Balanced Inside-Out (TBIO) дизайн сборки гена, при котором только два центральных олигонуклеотида имеют комплементарные участки. Однако последующий опыт синтеза генов показал, что предложенный способ применим и для других видов дизайна.

В методе TBIO олигонуклеотиды смысловой цепи покрывают одну половину синтона с 5'-конца, а олигонуклеотиды антисмысловой цепи – другую половину с 3'-конца. И только два праймера (смысловой и антисмысловой) перекрываются в центре синтона. Градиент концентраций олигонуклеотидов направляет синтез из центра последовательности к краям: центральные праймеры имеют наименьшую концентрацию, а концевые – наибольшую, для остальных пар концентрация повышается по мере продвижения от центра к краям.

3.1.1 Исследование обращенно-фазовых сорбентов для очистки протяженных олигонуклеотидов методом твердофазной экстракции

Проведена проверка шести вариантов коммерчески доступных ОФ сорбентов на основе силикагеля с разными модификациями поверхности. Определены основные критерии эффективности сорбента для ТФЭ олигонуклеотидов длиной около 50 н.: характер модификации силикагеля и диаметр пор.

C₁₈-силикагель с диаметром пор в 71 Å (картриджи Supelclean ENVI-18) продемонстрировал лучшие результаты для очистки 47-мерного модельного олигонуклеотида. Чистота конечного продукта (ВЭЖХ) составила 98,4%, а ёмкость сорбента – 170 пмоль/мг.

Установлено, что для очистки олигонуклеотидных блоков длиной около 50 н. предпочтительнее использовать C₁₈-силикагель с крупными порами. Емкость обращенно-фазовых сорбентов существенно уменьшается по мере приближения размеров олигонуклеотида к диаметру пор сорбента. Протяженные олигонуклеотиды могут связываться только с поверхностью сорбента, но не способны к сорбции внутри пор слишком малого размера.

Для стандартного картриджа для ТФЭ (100 мг) минимальный объем элюента составляет 0,5 мл, что создает необходимость включения в процесс синтеза генов стадии упаривания растворителя перед сборкой ДНК. Ввиду этого дальнейшая работа заключалась в миниатюризации системы ТФЭ. Для этого сорбентом из картриджей Supelclean ENVI-18 заполняли пустые колонки для олигонуклеотидного синтеза (на 200 мкл элюента) и использовали наконечники для ТФЭ Supelco Supel-Tips C18 (на 2 мкл элюента), сорбент в которых имеет значительно больший диаметр пор (200 Å).

3.1.2 Очистка олигонуклеотидов на наконечниках для ТФЭ

На примере модельных олигонуклеотидов (39- и 50-меры), разработана эффективная методика очистки (таблица 1). Масс-спектрометрический анализ

показал, что наконечники для ТФЭ позволяют избавиться от укороченных продуктов синтеза.

Таблица 1 – Очистка олигонуклеотидов методом твердофазной экстракции

Стадия	Реагент	Система ТФЭ		
		Картриджи	Колонки	Наконечники
		Объем / вакуум	Объем / повторы	Объем / повторы
Кондиционирование	MeCN	1 мл / +	0,5 мл / 3 раза	10 мкл / 3 раза
	ТЭАА	1 мл / -	0,5 мл / 3 раза	10 мкл / 3 раза
Связывание	образец в ТЭАА	0,5 мл / -	0,5 мл / 5 раз	10 мкл / 5 раз
Промывка	ТЭАА	1 мл / +	0,5 мл / 3 раза	10 мкл / 3 раза
	5% MeCN в ТЭАА	–	0,5 мл / 3 раза	10 мкл / 3 раза
	11% MeCN в ТЭАА	1 мл / +	–	–
Детритилирование	2% ТФУ	1 мл / +	0,5 мл / 3 раза	10 мкл / 3 раза
	ТЭАА	1 мл / +++	0,5 мл / 3 раза	10 мкл / 3 раза
Элюция	20% MeCN	0,5 мл / -	0,2 мл / 5 раз	2 мкл / 5 раз

Примечание – MeCN – ацетонитрил, ТЭАА – триэтиламин-ацетатный буфер (0,1 М, рН 8,0), ТФУ – трифторуксусная кислота.

Измеренная экспериментально емкость наконечника составила 40 пмоль для 50-мерного и 70 пмоль для 39-мерного олигонуклеотида. Емкость сорбента ниже для более протяженного олигонуклеотида. Уже связавшиеся молекулы предположительно мешают сорбции новых молекул. Этот эффект тем сильнее выражен, чем длиннее олигонуклеотид.

Олигонуклеотидные блоки для синтеза ДНК имеют длину 40–70 н. В олигонуклеотидном пуле также могут присутствовать концевые праймеры для амплификации всей последовательности длиной 20–30 н. По причине неоднородности длин для предварительных расчетов схем синтеза использовали усредненное значение емкости наконечника равное 55 пмоль. Результаты электрофореза в ПААГ (рисунок 1) показали, что метод ТФЭ не позволяет полностью избавиться от примесей, но существенно улучшает чистоту конечного продукта.

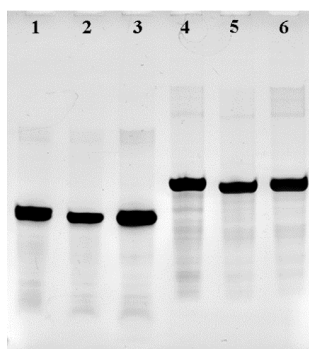
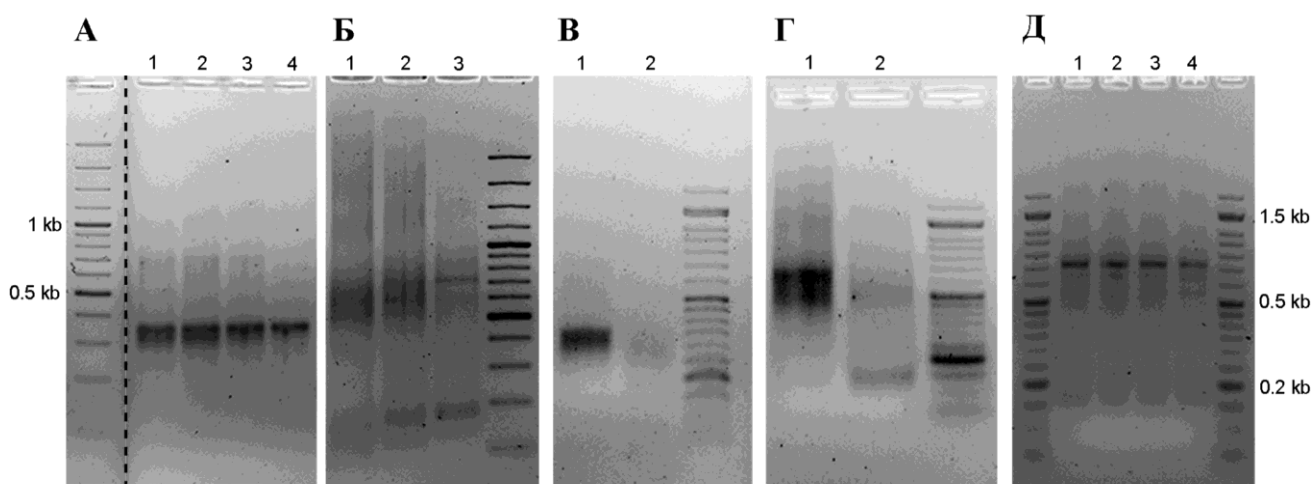


Рисунок 1 – Результаты электрофореза в ПААГ для исходных (1, 4), очищенных на картридже (2, 5) и с использованием наконечника (3, 6) 39-мерного и 50-мерного олигонуклеотидов

3.1.3 ТВЮ-сборка с использованием смесей олигонуклеотидов, очищенных на разных системах для ТФЭ

Осуществлены два ТВЮ-синтеза модельного гена усиленного зеленого флуоресцирующего белка (EGFP) (717 п.н.), отличающиеся длиной олигонуклеотидных блоков (50 и 65 н.). Результаты ферментативных синтезов не отличались по продуктам. Последующие работы по оптимизации проведены с 50-мерными олигонуклеотидными блоками.

Синтез гена EGFP состоит из сборки центрального фрагмента длиной 352 п.н. из шести пар олигонуклеотидов, его элонгации шестью парами с образованием гена длиной 717 п.н., а также последующей амплификации двумя концевыми праймерами. Использовали три градиента концентраций пар олигонуклеотидов: градиент 1 – 40, 60, 80, 100, 120 и 200 нМ (из оригинального метода ТВЮ), градиент 2 – 20, 30, 40, 50, 60 и 200 нМ, градиент 3 – 8, 12, 16, 20, 24 и 200 нМ. Растворы олигонуклеотидов смешивали перед очисткой, которую проводили на двух системах: колонках и наконечниках для ТФЭ. Контрольная смесь была изготовлена из индивидуально очищенных олигонуклеотидов. Результаты полимеразной цепной сборки (ПЦС) приведены на рисунке 2.



А – сборка центрального фрагмента гена (1 – картриджи, индивидуальная очистка олигонуклеотидов, градиент 1; 2 – колонка, очистка смеси, градиент 1; 3 – колонка, очистка смеси, градиент 2; 4 – колонка, очистка смеси, градиент 3);

Б – элонгация центрального фрагмента (очистка смеси на колонке) (1 – градиент 1; 2 – градиент 2; 3 – градиент 3); В – сборка центрального фрагмента гена (очистка смеси на наконечнике) (1 – градиент 1, 2 – градиент 3); Г – элонгация центрального фрагмента (очистка смеси на наконечнике) (1 – градиент 1, 2 – градиент 3); Д – амплификация гена, полученного из олигонуклеотидов, очищенных на разных системах ТФЭ (1 – картриджи, градиент 1, 2 – колонка, градиент 1, 3 – колонка, градиент 3, 4 – наконечник, градиент 1)

Рисунок 2 – Результаты электрофореза продуктов ТВЮ-сборки, ТВЮ-элонгации и амплификации гена EGFP в 2% агарозном геле

Различий в продуктах синтеза, полученных из индивидуально и совместно очищенных олигонуклеотидов, не установлено (рисунок 2, А1–А2). Наилучшие результаты сборки получились для градиента 3 (рисунок 2, А4). Лучший результат элонгации достигнут при оптимизированной температуре отжига 62 °С и при градиенте 3 (рисунок 2, Б3).

В случае наконечников для ТФЭ наилучшие результаты сборки (рисунок 2, В1) и элонгации (рисунок 2, Г1) получены для градиента 1. Это можно объяснить тем, что существенная разница в концентрации центральных и краевых олигонуклеотидов в градиенте 3 в условиях избытка краевых праймеров и ограниченной емкости наконечника затруднила сорбцию остальных пяти олигонуклеотидных пар.

Продукты ПЦР после сборки гена из индивидуально очищенных олигонуклеотидов (градиент 1), из совместно очищенных на колонке (градиенты 1 и 3) и на наконечнике для ТФЭ (градиент 1) были амплифицированы с образованием продуктов одинаковой длины (рисунок 2, Д). Идентичность последовательности подтверждена секвенированием по Сэнгеру.

Таким образом, качество очищенных методом ТФЭ пулов олигонуклеотидов позволяет синтезировать гены с минимальным количеством ошибок, а используя миниатюризированные системы ТФЭ известной емкости, можно устранить трудоемкие и затратные по времени стадии определения концентрации (1 мин/образец) и выпаривания растворителя (5 ч).

3.2 «One-pot» ТВС-ТВЮ сборка ДНК-синтона

Синтон – днДНК длиной от 500 до 1000 п.н., полученная за один этап химико-ферментативного синтеза. В методе сборки синтонов Thermodynamically-Balanced Conventional Assembly (ТВС) олигонуклеотиды последовательно покрывают обе цепи гена с пропусками, которые компенсированы олигонуклеотидами другой цепи и заполняются ДНК-полимеразой, и перекрывающиеся участки имеют близкие температуры отжига.

ТВС позволяет получать предельные по длине синтоны (1 kb) при наличии большого количества побочных продуктов неверной длины, а частота ошибок в продуктах верной длины составляет 0,1–1%. ТВЮ-сборка дает возможность получать за раунд короткие синтоны (~0,5 kb) при малом количестве неверных по длине продуктов и одной из самых низких частот ошибок среди всех способов ПЦС (0–0,3%).

Предложен подход, который представляет собой комбинацию этих двух способов сборки в одной пробирке за один раунд ПЦР, после чего следует амплификация продукта сборки с концевыми праймерами во второй пробирке за второй раунд ПЦР («one-pot» сборка ДНК-синтона). В результате получается обогащенный целевым синтоном продукт, пригодный для встраивания в

плазмидный вектор. «One-pot» сборка требует стадии амплификации перед клонированием.

На примере гена холестериноксидазы (ChOx) из *Streptomyces lavendulae* (1544 п.н.) выполнена оптимизация способа сборки: выбор фермента, подбор градиента концентраций олигонуклеотидов и разработка температурной программы. Подход успешно применен для синтеза гена холестериноксидазы из *Rhodococcus sp.* близкой длины (1573 п.н.).

3.2.1 Многостадийная ТВС-ТВЮ сборка

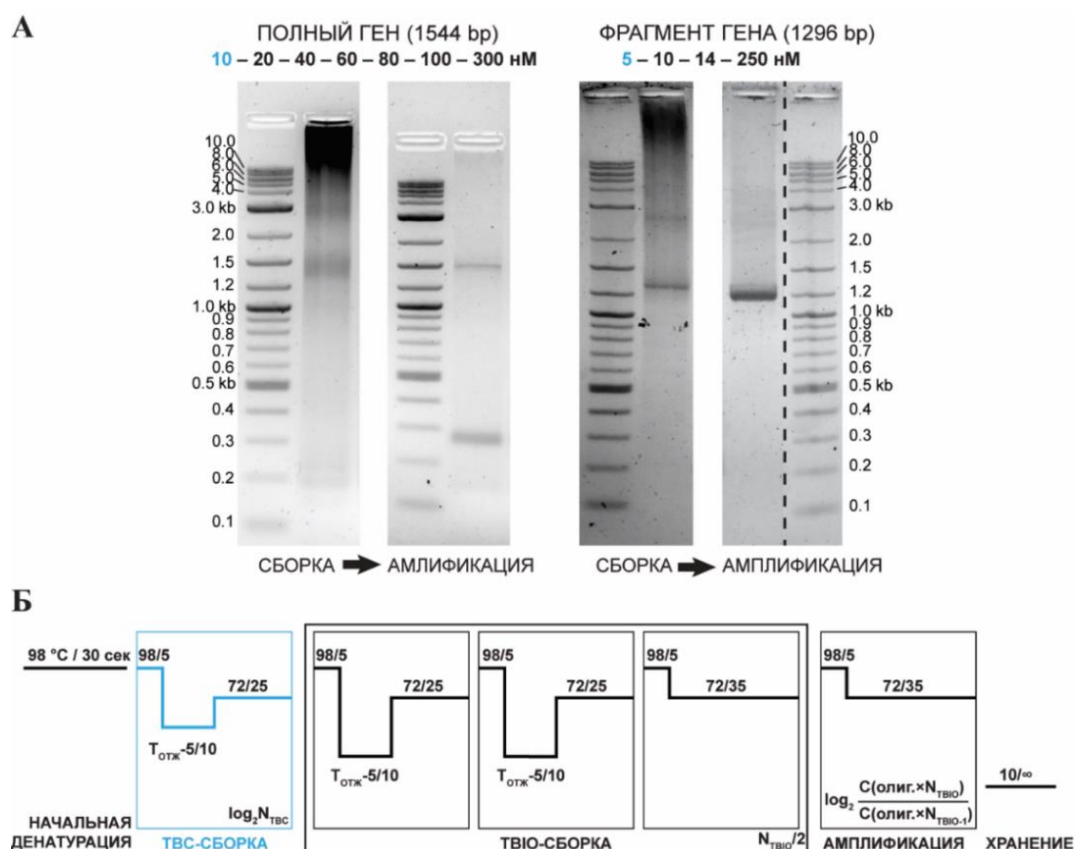
Чтобы убедиться в принципиальной возможности осуществления ТВС-ТВЮ сборки для синтона длиной 1544 п.н., схема была реализована в простой системе из 4 отдельных ПЦР с использованием полимеразы DreamTaq: ТВС-сборка из 13 пар олигонуклеотидов, амплификация ТВС-фрагмента концевыми ТВС-праймерами, ТВЮ-элонгация с тремя парами олигонуклеотидов, ТВЮ-элонгация с еще тремя парами праймеров. Двухстадийный «one-pot» вариант сборки реализовать не удалось: ТВС-ТВЮ сборка, затем амплификация с концевыми ТВЮ-праймерами. Для реализации схемы тестировались другие коммерчески доступные полимеразы.

3.2.2 Выбор ДНК-полимеразы для «one-pot» ТВС-ТВЮ сборки

На примере получения синтона длиной 1296 п.н. (13 пар ТВС- и три пары ТВЮ-олигонуклеотидов), проверено пять ДНК-полимераз. Целевой продукт был получен только в случае двух ферментов (Q5 и Flash), отличительной особенностью которых является отсутствие 5',3'-экзонуклеазной активности. Анализ результатов показал, что этот вид активности может препятствовать сборке центрального фрагмента из олигонуклеотидных блоков, концентрация которых очень низка. Наличие 5',3'-экзонуклеазной активности наряду с невысокой точностью отличает Taq-полимеразы (в т.ч. DreamTaq) от Pfu-полимераз (Q5 и Flash).

3.2.3 Оптимизация градиента концентраций олигонуклеотидов

Определены оптимальные условия ТВС-ТВЮ сборки (рисунок 3, А). Концентрация ТВС-олигонуклеотидов может находиться в диапазоне 5–40 нМ, концевых ТВЮ-олигонуклеотидов – 250–300 нМ. Отношение концентраций ТВС- и первой пары ТВЮ-олигонуклеотидов должно быть более 1,4. Экспериментально установленное оптимальное значение равно двум. Максимальная концентрация концевых ТВЮ-олигонуклеотидов – 300 нМ, оптимальная концентрация – 200–250 нМ. Оптимизация градиента концентраций олигонуклеотидов позволила провести сборку полного гена (1544 п.н.) и его фрагмента (1296 п.н.). Без последующей очистки ген лигировали в вектор pJET1.2/blunt, последующее секвенирование подтвердило правильность его последовательности.



А – результаты электрофореза продуктов сборки гена холестериноксидазы и его фрагмента при оптимальных градиентах концентраций олигонуклеотидов и оптимальном ПЦР-цикле в 2% агарозном геле; Б – ПЦР-цикл в общем виде

Рисунок 3 – Программируемый ТВС-ТВЮ ферментативный синтез гена

3.2.4 Программируемая сборка протяженных ДНК-синтонов

Разработана специализированная температурная программа, учитывающая механизмы процессов, протекающих на разных стадиях ТВС-ТВЮ сборки и предполагающая использование Q5 ДНК-полимеразы (рисунок 3, Б). Более высокая $T_{отж}$ на стадии ТВС-сборки и ее снижение на последующей стадии ТВЮ-сборки обеспечивает высокую специфичность процесса. Результаты применения данного температурного цикла – на рисунке 3, А.

При выборе метода ТВС-ТВЮ сборки синтонов возрастают затраты времени на стадии дизайна и планирования его реализации. Однако данный метод в сравнении с существующими подходами позволяет получить более протяженную днДНК (~1,6 kb против 1 kb) с высоким содержанием целевого продукта в количестве, достаточном для перехода к последующей стадии: лигированию в плазмидный вектор, минуя очистку продукта ПЦР. Для реализации ТВС-ТВЮ подхода необходимо использовать ДНК-полимеразу, не имеющую 5',3'-экзонуклеазной активности, применять градиент концентраций олигонуклеотидов и задействовать адаптированный ПЦР-цикл, учитывающий механизмы процессов ферментативного синтеза.

3.2.5 Побочные продукты ТВС-ТВЮ сборки и конкатемерная цепная реакция

При проведении ферментативного синтеза днДНК образуются два типа ДНК-продуктов, детектируемых с использованием агарозного электрофореза и имеющих меньшую и большую молекулярную массу по сравнению с целевым геном. Образование укороченных молекул ДНК объясняется отжигом фланкирующих праймеров на продуктах начальных стадий сборки. Механизмы образования высокомолекулярных побочных продуктов (ВМПП), длина которых превышает длину целевого синтона, объяснить сложнее, а для их подтверждения необходимы экспериментальные данные.

Молекулярная масса ВМПП зависит от градиента концентраций олигонуклеотидных блоков: она уменьшается с увеличением концентрации ТВС-олигонуклеотидов с 5 до 40 нМ.

ПЦР-зондирование образующихся ВМПП позволило установить, что эти продукты являются конкатемерами, т.е. регулярно повторяющимися последовательностями ДНК в пределах одной протяженной последовательности.

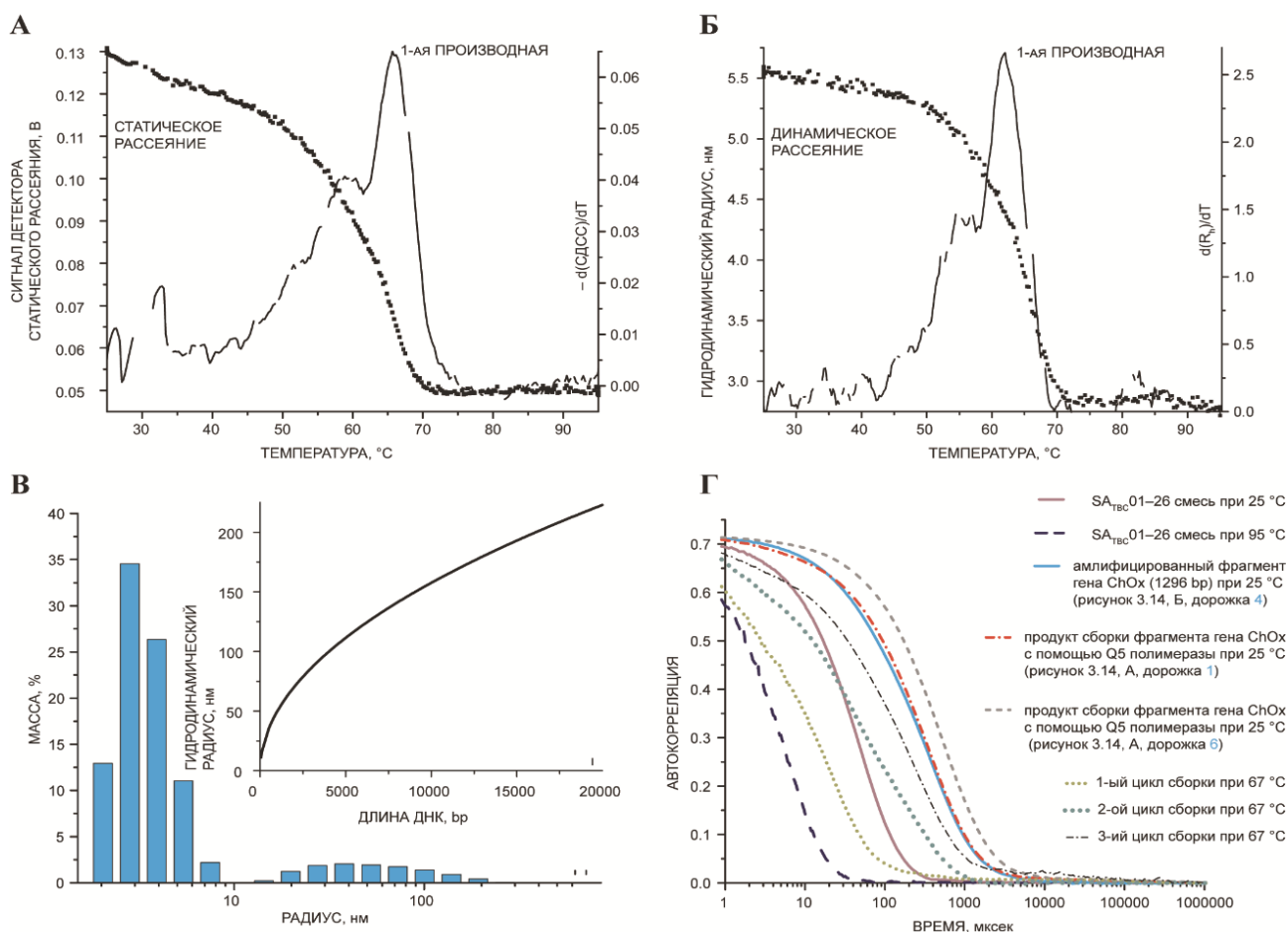
Предложен механизм образования ВМПП, который заключается в случайном формировании фрагментов днДНК с идентичными фланкирующими участками. В последующих циклах данные фрагменты многократно увеличиваются в длине в результате конкатемерной цепной реакции.

3.2.6 Мониторинг процесса сборки методами светорассеяния

Электрофорез в агарозном геле позволяет оценить только конечный результат сборки синтона и добавляет затраты времени и ресурсов ко всей процедуре химико-ферментативного синтеза. Онлайн-мониторинг одновременно со сборкой синтона позволил бы преодолеть эти ограничения. Ранее для таких целей было описано использование ПЦР в режиме реального времени. Поскольку ферментативный синтез ДНК сопровождается изменением размера молекулы, для слежения за процессом предложено использовать методы светорассеяния.

Рассеянный от частиц свет детектируется как сигнал с флуктуациями, соответствующими скоростям их броуновского движения. Выходные данные СРС/ДРС-спектрометра представляют собой автокорреляционную функцию (АКФ), т.е. зависимость флуктуаций интенсивности рассеянного света от времени накопления сигнала. Время затухания АКФ связано с коэффициентом диффузии частиц, по которому определяют их размер.

Процесс ТВС-сборки фрагмента ДНК длиной 1031 п.н. воссоздан нами в программируемом термостате прибора (рисунок 4, А и Б). Наблюдалось образование крупных частиц при температуре отжига олигонуклеотидов (около 67 °С). Размер частиц уменьшался при температуре плавления и выше её.



А – зависимость СРС от температуры для смеси 13 пар ТВС-олигонуклеотидов. Б – зависимость гидродинамического радиуса от температуры для смеси 13 пар ТВС-олигонуклеотидов. В – распределение молекул ТВС-синтона по массе и радиусу после амплификации (во вкладке – расчетный график зависимости гидродинамического радиуса от длины днДНК: 1031 п.н. = 50,6 нм). Г – АКФ следующих образцов: смесь ТВС-олигонуклеотидов при 25 °С (отжиг после плавления) и 95 °С (во время плавления); 1–3 циклы ТВС-сборки, проводимой в приборе для ДРС; фрагмент гена (1296 п.н.), собранный методом ТВС-ТВЮ с помощью двух градиентов концентраций олигонуклеотидов; амплифицированный после сборки фрагмент гена (1296 п.н.)

Рисунок 4 – Методы светорассеяния для анализа ТВС-ТВЮ сборки синтона

На рисунке 4, В показано распределение частиц разного радиуса и массы в образце днДНК длиной 1031 п.н., амплифицированном в термоциклере с помощью пары концевых праймеров. Распределение частиц построено программным обеспечением спектрометра на основании уравнения, описывающего АКФ образца. В пробе детектируются частицы с радиусом 50,6 нм, соответствующим длине 1031 п.н. Наличие частиц большего и меньшего радиуса можно объяснить тем, что после ПЦР в образце присутствуют остатки праймеров для амплификации, полимеразы и дНТФ.

На рисунке 4, Г представлены АКФ образцов на разных стадиях ТВС-ТВЮ сборки гена, в т.ч. ТВС-сборки в самом спектрометре. Графики функций отличаются по виду и описываются разными уравнениями. Значит, стадии процесса ТВС-ТВЮ сборки можно дифференцировать с использованием светорассеяния.

Таким образом, доказано, что методы СРС/ДРС позволяют следить за процессом сборки гена в режиме реального времени, однако для применения их на практике необходимо преодолеть ряд ограничений путем изменения дизайна измерительной ячейки и использования прибора, способного нагревать и охлаждать образец с большей скоростью, сопоставимой с амплификаторами для ПЦР (0,25 °C/сек против 1–3 °C/сек).

3.3 Двунитевая ДНК с 5'-диметокситритильными защитными группами: получение и применение в ферментативных реакциях

Ферментативная сборка ДНК приводит к образованию множества продуктов, среди которых имеется целевая последовательность. Укороченные побочные продукты сборки обладают преимуществом при встраивании в плазмидный вектор. По этой причине скрининг с целью обнаружения вектора с целевой вставкой приходится выполнять для значительного количества колоний. Для реализации селективного лигирования целевой последовательности по отношению к побочным продуктам внутренние олигонуклеотиды должны отличаться от внешних так, чтобы лигирование продуктов их объединения было невозможно. Предложено использовать 5'-диметокситритилированные (ДМТ) внутренние олигонуклеотиды, так как объемный и гидрофобный заместитель может препятствовать работе ДНК-лигазы. Укороченные побочные продукты ПЦС, имея 5'-ДМТ концы, не смогут встроиться в вектор.

В фосфорамидитном синтезе для блокирования 5'-ОН олигонуклеотида используют ДМТ-группу, которую можно сохранить и после его очистки. Стабильность 5'-ДМТ-группы олигонуклеотидов в условиях ПЦР не описана в литературе. Нет данных и о влиянии такой модификации на активность ферментов (полимераз, лигаз, экзонуклеаз).

3.3.1 Стабильность 5'-диметокситритильной защитной группы олигонуклеотидов в условиях ПЦР

Проведенные на модельных олигонуклеотидах исследования подтвердили, что 5'-ДМТ-группа при нагревании нестабильна в воде, однако достаточно стабильна в условиях ПЦР (около 80%). Эта устойчивость определяется рН и составом буфера для ПЦР. Результаты хроматографического анализа образцов ДМТ-олигонуклеотида 5'-ДМТ-дТ₁₅ после инкубации в различных буферах для ПЦР при температуре 98 °C в течение 5 минут, представлены на рисунке 5. Полное воспроизведение температурных условий ПЦР (25 циклов) приводит к детритилированию около 20% ДНК.

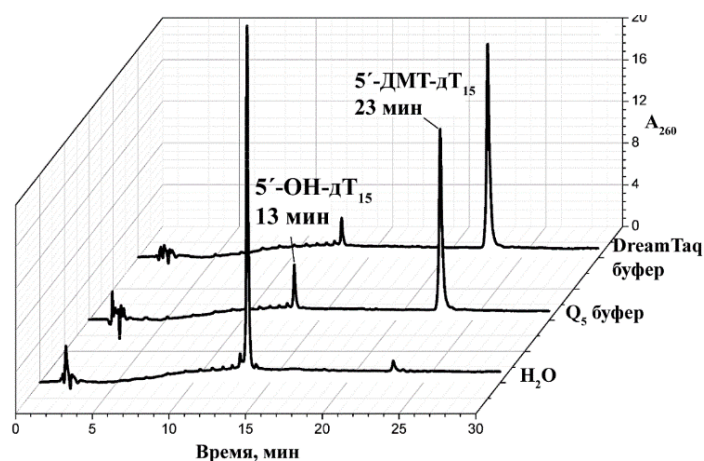
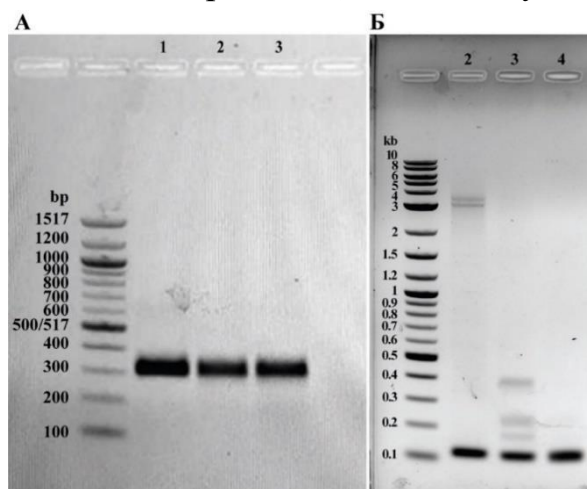


Рисунок 5 – Хроматограммы образцов 5'-ДМТ-дТ₁₅ олигонуклеотида после нагревания в воде и буферных растворах для Q5 и DreamTaq ДНК-полимераз (98 °С, 5 мин)

3.3.2 Сборка синтона из 5'-диметокситритилированных олигонуклеотидов

Показано, что из ДМТ-защищенных олигонуклеотидов можно получить ДМТ-модифицированную днДНК разных размеров. Короткую ДНК (менее 100 п.н.) получили путем отжига ДМТ-праймеров, более протяженную ДНК (около 300 п.н.) – путем ТВС-сборки из ДМТ-олигонуклеотидов (рисунок 6, А).



А – ТВС-сборка гена (312 п.н.) из 8 олигонуклеотидов в 1% агарозном геле (1 – сборка из ДМТ-олигонуклеотидов; 2 – из немодифицированных олигонуклеотидов; 3 – из внутренних ДМТ-олигонуклеотидов и концевых немодифицированных праймеров); Б – ПЦР продуктов лигирования фрагмента днДНК (65 п.н.) в вектор pJET1.2/blunt с праймерами вектора в 1,5% агарозном геле (2 – pJET1.2/blunt + T4 лигаза; 3 – pJET1.2/blunt + 5'-ОН днДНК + лигаза; 4 – pJET1.2/blunt + 5'-ДМТ днДНК + T4 лигаза)

Рисунок 6 – Полимеразная цепная сборка гена из ДМТ-модифицированных олигонуклеотидов и селективное лигирование диметокситритилированной днДНК в плазмидный вектор

3.3.3 Селективное лигирование двунитевой ДНК, модифицированной диметокситритильной группой, в плазмидный вектор по тупым концам

Исследования влияния ДМТ-модификации ДНК на активность Т4 лигазы проведены на фрагментах длиной 65 п.н. и 312 п.н. в ходе их лигирования в фосфорилированный плазмидный вектор pJET1.2/blunt по тупым концам. В качестве контроля осуществили лигирование таких же ДНК-фрагментов без модификации.

При амплификации продукта лигирования праймерами pJET1.2/blunt наличие ПЦР-фрагмента длиной 184 п.н. свидетельствует об объединении вставки и вектора в кольцевую ДНК (рисунок 6, Б). Такой фрагмент не обнаруживается для вставки с ДМТ, и присутствует в случае вставки без модификации. Полоска длиной 119 п.н. встречается на всех трех дорожках и соответствует замкнутому вектору без вставки.

Эффективность трансформации клеток *E. coli* продуктами лигирования для вставки длиной 65 п.н. без модификации составила 40 000 КОЕ/мкг, что в 10 раз больше, чем для вставки с ДМТ. Колонии обнаружены в обоих случаях, что можно объяснить присутствием небольшой доли молекул деблокированных днДНК, появившихся в ходе термоиндуцированного детритилирования на этапе получения вставки с ДМТ.

Результаты аналитической ПЦР (рисунок 6, Б) и эффективность трансформации показывают, что ДМТ-группа препятствует лигированию с помощью Т4 лигазы. Это можно объяснить стерическим барьером, который создает гидрофобный и объемный заместитель при попадании в активный центр фермента.

Таким образом, предложен способ селективного лигирования целевых немодифицированных ДНК-синтонов в плазмидный вектор по тупым концам, позволяющий снизить затраты времени и материалов на стадии скрининга клонов процесса химико-ферментативного синтеза гена.

Ограничения использования ДМТ-модификации следуют из лабильности этой группы в кислой среде и при нагревании. Ее отщепление приводит к формированию популяции деблокированных ДНК. Следует избегать длительного хранения ДМТ-олигонуклеотидов (до 5 дней при -20 °С) и нагревания их растворов с кислым или нейтральным рН.

3.3.4 Влияние 5'-диметокситритильной защитной группы в составе двунитевой ДНК на ферментативную активность Т5-экзонуклеазы

Для оценки потенциала использования ДМТ-олигонуклеотидов проведено исследование влияния данной группы на Т5-экзонуклеазу. Установлено, что этот фермент не обладает специфичностью по отношению к ДМТ-модификации 5'-конца: модифицированные днДНК разрушаются ферментом так же, как и немодифицированные днДНК и 5'-ДМТ олигонуклеотиды.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

1. Впервые предложен способ очистки пулов олигонуклеотидных блоков методом ТФЭ на обращенно-фазовом сорбенте известной емкости, который одновременно позволяет осуществлять дозирование смеси, необходимое для проведения одной реакции сборки синтона [1-А; 5-А; 6-А].

2. Разработан метод программируемой ферментативной сборки синтонов, основанный на комбинации двух способов дизайна олигонуклеотидных блоков и специальной температурной программы синтеза, который позволяет получать обогащенные целевой последовательностью и протяженные (более 1,5 kb) синтоны за один этап [2-А; 7-А].

3. Показано, что динамическое светорассеяние может быть использовано в качестве метода наблюдения за ферментативной сборкой двунитевой ДНК в режиме реального времени [2-А; 8-А].

4. Предложен механизм образования в процессе сборки синтонов высокомолекулярных побочных продуктов, заключающийся в формировании последовательности с идентичными фланкирующими участками в результате некорректного отжига концевых олигонуклеотидов с последующей конкатемерной цепной реакцией [2-А].

5. Установлена стабильность 5'-диметокситритильной защитной группы олигонуклеотидов в условиях полимеразной цепной реакции и выявлено влияние 5'-диметокситритильной защиты на активность Т4 лигазы в реакции сшивания тупых концов двунитевой ДНК, что позволило предложить способ селективного по отношению к укороченным побочным продуктам лигирования целевых генов в плазмидный вектор [3-А; 4-А; 9-А; 10-А].

Рекомендации по практическому использованию результатов

При выполнении диссертационной работы создана оригинальная лабораторная технология химико-ферментативного *de novo* синтеза, позволяющая получать протяженные (до 1600 п.н.) ДНК-синтоны с минимизированной вероятностью возникновения ошибок.

На основании выполненных исследований созданы и утверждены два лабораторных технологических регламента, которые используются при синтезе искусственных генов в рамках хозяйственных договоров с организациями Республики Беларусь.

Получен патент на изобретение: Способ получения смеси очищенных олигонуклеотидов для ферментативного синтеза двуцепочечной ДНК : пат. ВУ 23440 / А.В. Янцевич, В.В. Щур, С.А. Усанов. – Опубл. 30.06.2021.

Разработанная технология использована при *de novo* синтезе двунитевой ДНК (41 синтетический ген общей протяженностью 43 644 п.н.) в рамках выполнения договоров с организациями Республики Беларуси, работающими в области биотехнологии.

Разработанная технология, подходы и методы используются при организации производственного участка по синтезу искусственных генов и библиотек генов для создания диагностически и терапевтически значимых ферментов и моноклональных антител в рамках мероприятия 10 «Разработать технологию получения библиотек синтетических генов для создания диагностически и терапевтически значимых ферментов и моноклональных антител» подпрограммы 5 «Химические продукты и молекулярные технологии» Государственной программы «Наукоемкие технологии и техника» на 2021-2025 гг.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ

Статьи в рецензируемых научных журналах:

1-А. Yantsevich A. V., **Shchur V. V.**, Usanov S. A. Oligonucleotide Preparation Approach for Assembly of DNA Synthons // SLAS Technol. – 2019. – Vol. 24, iss. 6. – P. 556–568.

2-А. **Shchur V. V.**, Burankova Y. P., Shapira M. A., Klevzhits D. V., Usanov S. A., Yantsevich A. V. Programmed Assembly of Long DNA Synthons: Design, Mechanism, and Online Monitoring // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2019. – Vol. 103, iss. 21-22. – P. 9103–9117.

3-А. **Щур В. В.**, Жолнерович А. И., Буренкова Ю. П., Янцевич А. В., Усанов С. А. Стабильность 5'-диметокситритильной защитной группы синтетического олигонуклеотида в условиях полимеразной цепной реакции // Вес. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2020. – Т. 56, № 4. – С. 457–464.

4-А. **Shchur V. V.**, Burankova Y. P., Zhauniarovich A. I., Dzichenka Y. V., Usanov S. A., Yantsevich A. V. 5'-DMT-protected double-stranded DNA: Synthesis and competence to enzymatic reactions // Anal. Biochem. – 2021. – Vol. 617, iss. 114115. – P. 1–13.

Тезисы докладов и материалы конференций:

5-А. **Щур В. В.**, Янцевич А. В., Усанов С. А. Определение емкости обращенно-фазовых сорбентов для твердофазной экстракции протяженных синтетических олигонуклеотидов // Молодёжь в науке – 2.0'18: тезисы докладов XV международной научной конференции молодых учёных. – Минск, 2018. – С. 208.

6-A. Yantsevich A., **Shchur V.**, Usanov S. Sequence-specific optimization of reverse-phase solid phase extraction for long oligonucleotides // Chemistry, Structure and Function of Biomolecules: book of abstracts of VI International Conference. – Minsk, 2018. – P. 167–170.

7-A. **Щур В. В.**, Усанов С. А., Янцевич А. В. Программируемая сборка протяженных ДНК синтонов // VI Международная конференция молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов: сборник тезисов. – Новосибирск, 2019. – С. 669–672.

8-A. Yantsevich A., **Shchur V.**, Shapira M., Dichenko Y., Usanov S. Light scattering techniques as a tool for on-line monitoring of artificial gene assembly by thermostable DNA polymerases // 56th Meeting of Serbian Chemical Society: book of abstracts. – Belgrad, 2019. – P. 78.

9-A. **Щур В. В.**, Буренкова Ю. П., Жолнерович А. И., Усанов С. А., Янцевич А. В. Двухцепочечная ДНК с 5'-ДМТ защитными группами: получение и участие в лигазной реакции // VII Международная конференция молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов: сборник тезисов – Новосибирск, 2020. – С. 599–601.

10-A. **Щур В. В.**, Буренкова Ю. П., Янцевич А. В. Температурная стабильность 5'-диметокситритилированных олигонуклеотидов // Технология органических веществ: материалы докладов 85-ой научно-технической конференции профессорско-преподавательского состава, научных сотрудников и аспирантов (с международным участием) – Минск, 2021. – С. 326–328.

Патент на изобретение:

11-A. ВУ 23440 С1, 2021.



РЕЗЮМЕ

Щур Вероника Владимировна

Разработка новых подходов к получению синтетической ДНК

Ключевые слова: синтез ДНК, ДНК-синтон, синтетический ген, олигонуклеотиды, полимеразная цепная сборка, твердофазная экстракция, конкатемеры, динамическое светорассеяние, 4,4'-диметокситритильная группа

Цель работы: разработка эффективной лабораторной технологии химико-ферментативного *de novo* синтеза протяженных молекул двунитевой ДНК.

Методы исследования: синтез олигонуклеотидов, полимеразная цепная реакция, клонирование, секвенирование, спектрофотометрия, электрофорез, хроматография, масс-спектрометрия, методы светорассеяния.

Полученные результаты и их новизна: впервые разработан способ очистки-дозирования пулов олигонуклеотидов для сборки днДНК с использованием наконечников для твердофазной экстракции с обращенно-фазовым сорбентом известной емкости. Разработан новый метод полимеразной цепной сборки днДНК на основе комбинации двух известных подходов, позволяющий увеличить предельную длину синтона с 1 до 1,6 kb и получить высокий выход конечного продукта. Предложен механизм образования побочных продуктов полимеразной цепной сборки, в основе которого лежит конкатемерная цепная реакция. Показана возможность использования методов светорассеяния для наблюдения за сборкой днДНК в режиме реального времени. Описаны методы получения, стабильность и влияние на активность ДНК-ферментов 5'-диметокситритилированных олигонуклеотидов и днДНК. Разработан метод селективного лигирования таких модифицированных днДНК в плазмидный вектор, позволяющий удалить укороченные побочные продукты из пула продуктов сборки синтона.

Рекомендации по использованию: разработанная оригинальная лабораторная технология используется в настоящее время для *de novo* синтеза днДНК в рамках выполнения договоров с организациями Республики Беларусь, а также для научных исследований и научно-технических разработок в рамках государственных программ. Данная технология может использоваться для получения рекомбинантных белков, вакцин, а также препаратов для генотерапии.

Область применения: биоорганическая химия, синтетическая биология, молекулярная биология, белковая инженерия, биотехнология.

РЭЗІЮМЭ

Шчур Вераніка Уладзіміраўна

Распрацоўка новых падыходаў да атрымання сінтэтычнай ДНК

Ключавыя словы: сінтэз ДНК, ДНК-сінтон, сінтэтычны ген, алігануклеатыды, палімеразная ланцуговая зборка, цвёрдафазная экстракцыя, канкатэмеры, дынамічнае расейванне святла, 4,4'-діметоксітрытыльная група.

Мэта работы: стварэнне эфектыўнай тэхналогіі сінтэзу працяглых малекул двухніткавай ДНК зададзенай структуры.

Метады даследавання: сінтэз алігануклеатадаў, палімеразнай ланцуговая рэакцыя, кланаванне, секвеніраванне, спектрафотаметрыя, электрофарэз, храматаграфія, мас-спектраметрыя, метады расейвання святла.

Атрыманыя вынікі і іх навізна: упершыню распрацаваны спосаб ачысткі-дазавання пулаў алігануклеатадаў для зборкі днДНК з выкарыстаннем наканечнікаў для цвёрдафазнай экстракцыі са звернута-фазавым сарбентам вядомай ёмістасці. Распрацаваны новы метады палімеразнай ланцуговой зборкі днДНК на аснове камбінацыі двух вядомых падыходаў, які дазваляе павялічыць гранічную даўжыню сінтона з 1 да 1,6 kb і атрымаць высокі выхад канчатковага прадукта. Прапанаваны механізм фарміравання пабочных прадуктаў палімеразнай ланцуговой зборкі, у аснове якога ляжыць канкатэмерная ланцуговая рэакцыя. Паказана магчымасць прымянення метадаў расейвання святла для назірання за зборкай днДНК ў рэжыме рэальнага часу. Апісаны метады атрымання, стабільнасць і ўплыў на актыўнасць ДНК-ферментаў 5'-діметоксітрытыліраваных алігануклеатадаў і днДНК. Распрацаваны метады селектыўнага лігавання такіх мадыфікаваных днДНК у плазмідны вектар, які дазваляе пазбавіцца ад скарочаных пабочных прадуктаў з пула прадуктаў зборкі сінтона.

Рэкамендацыі па выкарыстанні: распрацаваная арыгінальная лабараторная тэхналогія ў цяперашні час выкарыстоўваецца для *de novo* сінтэзу днДНК у рамках выканання дагавораў з арганізацыямі Рэспублікі Беларусь, а таксама для навуковых даследаванняў і навукова-тэхнічных распрацовак у рамках дзяржаўных праграм. Дадзеная тэхналогія можа выкарыстоўвацца для атрымання рэкамбінантных бялкоў, вакцын, а таксама прэпаратаў для генатэрапіі.

Галіна выкарыстання: біяарганічная хімія, сінтэтычная біялогія, малекулярная біялогія, бялковая інжынерыя, біятэхналогія.

SUMMARY

Shchur Veronika Vladimirovna

Development of new approaches to synthetic DNA obtaining

Keywords: DNA-synthesis, DNA-synthon, synthetic gene, oligonucleotides, polymerase chain assembly, solid phase extraction, concatemers, dynamic light scattering, 4,4'-dimethoxytrityl group.

Aim of the work: creation of efficient technology for synthesis of long double stranded DNA molecules of defined structure.

Methods of the research: oligonucleotide synthesis, polymerase chain reaction, cloning, sequencing, spectrophotometry, electrophoresis, chromatography, mass-spectrometry, light scattering techniques.

Obtained results and their novelty: an approach for the dsDNA assembly based on purification-dosage of oligo pools using tips for solid-phase extraction with reverse-phase sorbent of known capacity has been proposed for the first time. A new method for the polymerase chain assembly of dsDNA based on a combination of two known approaches was developed, which makes it possible to increase the maximum synthon length from 1 to 1.6 kb and obtain a high yield of the final product. Mechanism of by-product formation during polymerase chain assembly was proposed: concatemer chain reaction based on mispriming of oligonucleotides during first stages of assembly. The possibility of using light scattering methods to monitor dsDNA assembly in real time was shown for the first time. Preparation methods, stability characteristics, and the effect on DNA enzymes activities of 5'-dimethoxytritylated oligonucleotides and dsDNA were described. A method was developed for the selective ligation of the modified dsDNA into a plasmid vector, which makes it possible to eliminate truncated by-products from the pool of synthon assembly products.

Recommendations for application: the developed technology is currently used for *de novo* synthesis of dsDNA ordered by commercial companies of Republic of Belarus and for R&D projects of government programs for scientific research. This technology can be used to produce recombinant proteins, vaccines and drugs for gene therapy.

Area of application: bioorganic chemistry, synthetic biology, molecular biology, protein engineering, biotechnology.