

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ  
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

**НАУЧНЫЙ ДОКЛАД**  
**об основных результатах выполненной**  
**научно-квалификационной работы**

**Создание и реализация подходов к химико-ферментативной сборке протяженных  
двухцепочечных последовательностей ДНК**

Направление подготовки

04.06.01 Химические науки

Научная специальность

1.4.9. Биоорганическая химия

Аспирант \_\_\_\_\_ Переверзев И. М.

Научный руководитель \_\_\_\_\_ к.х.н. Довыденко И. С.

Новосибирск – 2023

Работа выполнена в лаборатории синтетической биологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск.

Научный руководитель: **Довыденко Илья Сергеевич**, кандидат химических наук, заведующий Лаборатории синтетической биологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск.

## 1. Общая характеристика работы

### 1.1. Актуальность проблемы

Синтез протяженных двуцепочечных ДНК (длиной более 200 п.н.) имеет большое значение для современной молекулярной биологии и генной инженерии, поскольку позволяет создавать синтетические фрагменты нуклеиновых кислот с заданной последовательностью нуклеотидов без использования матрицы ДНК.

Возможность синтезировать ген *de novo* была впервые показана в 70-х годах (Agarwal et al., 1970). Позже была протестирована активность *in vivo* синтетических генов (Ryan et al., 1979). С тех пор технология синтеза искусственных генов была значительно усовершенствована. В настоящее время она опирается на современные методы синтеза олигонуклеотидов (Brzezinska et al., 2023), различные способы сборки генных конструкций, такие как LCA (Hughes, 2017), PCA (TerMaat et al., 2009) и ТВЮ (Scarlett, 2023) с использованием высокоточной ДНК-полимеразы (Eckert & Kunkel, 1991), (Dolgova & Stukolova, 2017) и высокопроизводительные методы секвенирования ДНК, (Shendure et al., 2017). В последнее десятилетие были разработаны современные подходы к сборке больших (до десятков и сотен тысяч п. н.) молекул ДНК (Gibson et al., 2009), (Gibson et al., 2010) и исправлению ошибок в синтезированном гене (Saaem et al., 2012).

Тем не менее, разработка методов для снижения ошибочности синтетических генных конструкций остаётся актуальной, по причине высокой стоимости высокоточной полимеразы, необходимой для сборки генных конструкций, и высокоточного синтеза олигонуклеотидов. Следует отметить, что для сборки методом LCA полимеразы также необходима на этапе амплификации продукта. Так, цена наиболее высокоточной Phusion® HF ДНК-полимеразы производства New England Biolabs: 90538,39р за 500 е.а. (181р/е.а.); Phanta Max высокоточной ДНК-полимеразы производства Nanjing Vazyme Biotech: 65037,46р за 1000 е.а. (65р/е.а.). В то же время, цена менее точных аналогов MBUision производства МБС- Технология: 15000 на 400е.а. (37,5р/е.а.); фьюжн ДНК-полимераза Pfu-Sso7d производства Биолабмикс: 14000р за 500е.а. (28р/е.а.). При наличии эффективного и дешёвого способа снижения ошибочности генных конструкций откроется возможность использования более доступных олигонуклеотидов и полимераз для сборки синтетических генных конструкций. Следует отметить, что метод ТВЮ имеет некоторые ограничения, по сравнению с PCA и LCA. Так при сборке методом ТВЮ за 1 реакцию можно собирать конструкцию только из 6 пар олигонуклеотидов (Gao et al., 2003), что ограничивает максимальную длину генной конструкции, по сравнению с LCA и PCA. В связи с этим, далее рассматривали только методы PCA и LCA.

**Цель:** отработка подхода для ферментативной сборки протяженных двуцепочечных последовательностей ДНК (до 1000 п.н.), не содержащих ошибок, методами полимеразной цепной сборки и лигазной цепной сборки из олигонуклеотидов.

**Задачи:**

- 1) отработать протоколы и осуществить ферментативную сборку протяженных последовательностей ДНК на примере нескольких выбранных модельных последовательностей длиной до 1000 п.н.;
- 2) провести анализ источников ошибок в синтетических генных конструкциях;
- 3) провести поиск новых способов минимизации ошибок в генных конструкциях и определить их эффективность.

**1.2. Научная новизна и практическая значимость работы**

Были отработаны подходы к разбиению последовательности на олигонуклеотиды и сборке генных конструкций из олигонуклеотидов методами PCA и LCA. Было исследовано влияние различных факторов на ошибочность синтетических генных конструкций. Впервые была изучена возможность применения систем репарации *E. coli* для снижения ошибочности синтетических генных конструкций. Использование систем репарации *E. coli in vivo*, вместо мисматч-распознающих ферментов *in vitro*, для снижения ошибочности синтетических генных конструкций, позволяет упростить процедуру подготовки генных конструкций к клонированию, исключив этап обработки мисматч-распознающими ферментами.

**1.3. Публикации и апробация работы**

По результатам исследования опубликовано 7 работ, из них 7 тезисов конференций (в 3 из них докладчик Переверзев И.М.)

1. **Переверзев Иван Максимович.** Совершенствование подходов к химико-ферментативной сборке протяженных двуцепочечных последовательностей ДНК. Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ - 2019» ISBN 978-5-317-06100-5 (тезисы);

2. **И. М. Переверзев.** Совершенствование подходов к химико-ферментативной сборке протяженных двухцепочечных последовательностей ДНК. Материалы 57-й Международной научной студенческой конференции «МНСК-2019» ISBN 978-5-4437-0869-0 (тезисы);

3. Шевелев Г.Ю., **Переверзев И.М.**, Кечин А.А., Тупикин А.Е., Пышный Д.В. Коррекция ошибок при ферментативной сборке протяженных последовательностей ДНК.

Материалы Всероссийской мультikonференции с международным участием «Биотехнология – медицине будущего». ISBN 978-5-85957-150-6 (тезисы);

4. **И. М. Переверзев**, Н. А. Торгашева, О. И. Голосова, А. В. Тиунов, Г. Ю. Шевелев. Сравнительный обзор функциональных характеристик программ синтеза генов и ключевых параметров, используемых при оптимизации их структуры. Сборник тезисов VII международной конференции молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов, в рамках площадки открытых коммуникаций «OpenBio -2020». ISBN 978-5-4437-1114-0 (тезисы);

5. **И. М. Переверзев**, К. И. Яковлева, А. А. Кечин, И. С. Довыденко. Исследование точности синтеза ДНК-олигонуклеотидов. Сборник тезисов VIII международной научно-практической конференции молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов, в рамках площадки открытых коммуникаций «OpenBio -2021». ISBN 978-5-4437-1237-6 (тезисы);

6. Д. И. Сухомлинов, **И. М. Переверзев**. Genecut — программный инструмент для дизайна олигонуклеотидов, сборки и клонирования генных конструкций. Сборник тезисов VIII международной научно-практической конференции молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов, в рамках площадки открытых коммуникаций «OpenBio -2021». ISBN 978-5-4437-1237-6 (тезисы);

7. Sukhomlinov D., **Pereverzev I.**, Bondiuk S., Seryakov A. GeneCut – a software tool for oligonucleotide design, assembly and cloning of gene constructs. DOI 10.18699/SBB-20220-671. Сборник тезисов: Bioinformatics of genome regulation and structure/systems biology «BGRS/SB-2022» ISBN: 978-5-91291-059-3 (тезисы);

#### **1.4. Личный вклад автора**

Автором были проделаны: очистка олигонуклеотидов и их характеристика методами гель-электрофореза и УФ-спектроскопии, подбор условий и сборка генных конструкций методом полимеразной и лигазной циклической сборки, клонирование по липким концам, приготовление и трансформация электрокомпетентных клеток, выделение плазмидных конструкций из клеток *E. coli*, характеристика плазмид, выделенных из клонов методом ПЦР, элонгация комплексов олигонуклеотидов фрагментом Клёнова, обработка комплексов олигонуклеотидов эндонуклеазами, распознающими сайты с неспаренными основаниями, проведение реакции секвенирования по Сэнгеру, анализ результатов секвенирования методом Сэнгера и NGS.

## 2. Материалы и методы

### 2.1. Исходные реагенты и растворители

#### Реактивы

Смесь дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (дНТФ) (New England Biolabs, США),  $MgCl_2$  (New England Biolabs, США), плазмида pUC19 (ИХБФМ СО РАН), ампицилин (PanReac Applichem, Испания), IPTG (ThermoScientific, США), X-gal (ThermoScientific, США), агароза (Diagene, Россия), бромистый этидий (Helicon, Россия), Stains-all (Alfa Aesar, США), пептон (mp biomedical, США), дрожжевой экстракт (mp biomedical, США), агар (mp biomedical, США), глицерин (PanReac Applichem, Испания).

#### Буферные растворы

буфер W «СибЭнзим», буфер для реакции с фрагментом Клёнова 10× «СибЭнзим», буфер 10× для мисматч-распознающего фермента Корректазы™, смесь терминирующих нуклеозидтрифосфатов для проведения секвенирования методом Сэнгера («Nimagen» <https://www.nimagen.com/products/Sequencing/Capillary-Electrophoresis/BrilliantDye-Terminator-Cycle-Sequencing-Kit/>); буфер для проведения секвенирования методом Сэнгера («Nimagen» <https://www.nimagen.com/products/Sequencing/Capillary-Electrophoresis/BigDye-Terminator-5X-Sequencing-Buffer/>); Буфер Taq DNA лигазы (New England Biolabs, США): 20 mM Tris-HCl, 25 mM  $CH_3COOK$ , 10 mM  $Mg(CH_3COO)_2$ , 1 mM NAD, 10 mM DTT, 0.1% Triton® X-100, pH 7.3 при 25°C; Буфер T4 полинуклеотид киназы (New England Biolabs, США): 70 mM Tris-HCl, 10 mM  $MgCl_2$ , 5 mM DTT, pH 7.6 при 25°C

#### Ферменты

Phusion® High-Fidelity ДНК-полимераза (New England Biolabs, США), Фьюжн ДНК-полимераза Pfu-Sso7d (Биолабмикс, Россия), Taq ДНК полимераза (Биосан, Россия), РНКаза (Биолабмикс, Россия), эндонуклеаза рестрикции BamHI (СибЭнзим, Россия), эндонуклеаза рестрикции HindIII (СибЭнзим, Россия), эндонуклеаза рестрикции EcoRV (СибЭнзим, Россия), ДНК-лигаза фага T4 (Евроген, Россия), FastAP фосфатаза (Thermo Fisher Scientific, США), Термостабильная лигаза HiFi Taq DNA Ligase (New England Biolabs, США). T4 полинуклеотид киназа (New England Biolabs, США)

#### Среды для выращивания клеток

LB-среда (1 г пептона, 1г NaCl, 0,5 г дрожжевого экстракта на 100 мл  $H_2O$ ),

LB-агар (1 г пептона, 1г NaCl, 0,5 г дрожжевого экстракта, 1 г агара на 100 мл  $H_2O$ ).

При селекции по антибиотику – добавляли ампицилин до концентрации 0,1 мг/мл.

При бело-голубой селекции – добавляли IPTG до концентрации 0,1 мМ и X-Gal до концентрации 0,04 мг/мл.

### Клетки

В работе использовали электрокомпетентные клетки *E. coli* Nova Blue (Novagen, Германия)

### Буферные системы

Буферные растворы для проведения фенол-хлороформной экстракции плазмидной ДНК (Maniatis et al., 1984):

Буферный раствор 1: 0.02М EDTA; 0,2 мМ Tris-HCl; pH=8;

Буферный раствор 2: 1% SDS; 0,2М NaOH;

Буферный раствор 3: Ацетат калия 3М pH=4,8 (3М по K<sup>+</sup> и 5М по ac<sup>-</sup>);

ТЭААЭ: 40 мМ триэтаноламин, 20 мМ ледяная уксусная кислота, 1 мМ ЭДТА

### Последовательности олигонуклеотидов

Таблица 1. Олигонуклеотиды для сборки гена GFP методом PCA, полученные при разбиении последовательности GFP программой DNAworks

GFP_DNAworks_1	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCTGGTCGAG
GFP_DNAworks_2	TCGCCGACACGCTGAACTTGTGGCCGTTTACGTCGCCGTCCAGCTCGACCAGGATGGGC
GFP_DNAworks_3	AGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATC
GFP_DNAworks_4	ACGAGGGTGGGCCAGGGCACGGCAGCTTGCCGGTGGTGCAGATGAACTTCAGGGTCAGC
GFP_DNAworks_5	TGGCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGAC
GFP_DNAworks_6	AGCCTTCGGGCATGGCCGACTTGAAGAAGTCGTGCTGCTTCATGTGGTCGGGGTAGCGGC
GFP_DNAworks_7	CCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTCAAGGACGACGGCAACTACA
GFP_DNAworks_8	TTCACCAGGGTGTGCCCTCGAACTTCACCTCGGCGCGGGTCTTGTAGTTGCCGTCTGCC
GFP_DNAworks_9	GCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAAGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACA
GFP_DNAworks_10	ACGTTGTGGCTGTTGTAGTTGTACTCCAGCTTGTGCCCCAGGATGTTGCCGTCTCCTTG
GFP_DNAworks_11	CTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAA
GFP_DNAworks_12	AGCTGCACGCTGCCGTCTCGATGTTGTGGCGGATCTTGAAGTTCACCTTGATGCCGTTC
GFP_DNAworks_13	GGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTG
GFP_DNAworks_14	TTGCTCAGGGCGGACTGGGTGCTCAGTAGTGGTTGTCCGGCAGCAGCACGGGGCCGTG
GFP_DNAworks_15	GTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGT
GFP_DNAworks_16	CTTGACAGCTCGTCCATGCCGAGAGTGATCCCCGGCGGGTACGAACTCCAGCAGGAC

Таблица 2. Олигонуклеотиды для сборки гена GFP методом PCA, полученные при разбиении последовательности GFP программой GeneCut

GFP_GeneCut_1	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCT
GFP_GeneCut_2	CGCCGGACACGCTGAACTTGTGGCCGTTTACGTCGCCGTCCAGCTCGACCAGGATGGGCACCACC
GFP_GeneCut_3	GCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCC
GFP_GeneCut_4	GGGCCAGGGCACGGGCAGCTTGCCGGTGGTGCAGATGAACTTCAGGGTCAGCTTGCCG
GFP_GeneCut_5	CGTGCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCG
GFP_GeneCut_6	ACGTAGCCTTCGGGCATGGCCGACTTGAAGAAGTCGTGCTGCTTCATGTGGTCGGGGTAGCGGCT
GFP_GeneCut_7	GCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCCGC
GFP_GeneCut_8	CAGCTCGATGCCGTTACCAGGGTGTCCGCCCTCGAACTTCACCTCGGCGGGGTCTGTAGTTG

GFP_GeneCut_9	ACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGC
GFP_GeneCut_10	CTGCTTGTCTGGCCATGATATAGACGTTGTGGCTGTTGTAGTTGTACTCCAGCTTGTGCCCCAGGA
GFP_GeneCut_11	ATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGG
GFP_GeneCut_12	TCGCCGATGGGGTGTCTGCTGGTAGTGGTCGGCGAGCTGCACGCTGCCGTCTCGATGTTGTG
GFP_GeneCut_13	ACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCCACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCC
GFP_GeneCut_14	CGCGCTTCTCGTTGGGGTCTTTGCTCAGGGCGGACTGGGT
GFP_GeneCut_15	CCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGG
GFP_GeneCut_16	CTTGACAGCTCGTCCATGCCGAGAGTGATCCCGCGGGCGGT

Таблица 3. Олигонуклеотиды для сборки гена GFP методом LCA

Seq_01	CCATGGCGGGTTGACACG
Seq_02	CGTGTC AACCCGCCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG
Seq_03	ACCACCCCGGTGAACAGCTCCTCGCCCTTGCTCA
Seq_04	CTGTTACCGGGGTGGTGCCATCCTGGTCGAGC
Seq_05	CGTTTACGTCGCCGTCCAGCTCGACCAGGATGGGC
Seq_06	TGGACGGCGACGTA AACGGCCACAAGTTCAGCGTGT
Seq_07	CCCTCGCCCTCGCCGGACACGCTGAACTTGTGGC
Seq_08	CCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCA
Seq_09	CAGATGAACTTCAGGGTCAGCTTGCCGTAGGTGGCATCG
Seq_10	AGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGCAAGCTG
Seq_11	TGGGCCAGGGCACGGGCAGCTTGCCGGTGGTG
Seq_12	CCCGTGCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCCTG
Seq_13	ACTGCACGCCGTAGGTCAGGGTGGTCACGAGGG
Seq_14	ACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCC
Seq_15	CGTGCTGCTTCATGTGGTCGGGGTAGCGGCTGAAGC
Seq_16	GACCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGC
Seq_17	CCTGGACGTAGCCTTCGGGCATGGCGGACTTGAAGAAGT
Seq_18	CCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTCAAGG
Seq_19	GGTCTTGTAGTTGCCGTCGTCCTTGAAGAAGATGGTGCGCT
Seq_20	ACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGT
Seq_21	AGGGTGTGCCCTCGAACTTCACCTCGGGCGCG
Seq_22	TCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGC
Seq_23	CCTTGAAGTCGATGCCCTCAGCTCGATGCGGTTACCC
Seq_24	TGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGG
Seq_25	TGTAGTTGTACTCCAGCTTGTGCCCCAGGATGTTGCCGTCCT
Seq_26	GCACAAGCTGGAGTACAACATAACAGCCACAACGTCTATATCATGG
Seq_27	CCGTTCTTCTGCTTGTGCGCCATGATATAGACGTTGTGGCTGT
Seq_28	CCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCG
Seq_29	GCCGTCCTCGATGTTGTGGCGGATCTTGAAGTTCACCTTGATG
Seq_30	CCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCG
Seq_31	GGTGTCTGCTGGTAGTGGTCGGCGAGCTGCACGCT
Seq_32	ACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGGCGACGGCC
Seq_33	TCGGGCAGCAGCACGGGGCCGTCGCCGATGGG
Seq_34	CCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCC
Seq_35	TTTGCTCAGGGCGGACTGGGTGCTCAGGTAGTGGTTG
Seq_36	AGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGC
Seq_37	TCCAGCAGGACCATGTGATCGCGCTTCTCGTTGGGGTC
Seq_38	GATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCC
Seq_39	CCATGCCGAGAGTGATCCCGCGGGCGGTACGAAC

Seq_40	GGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTCAATCCC
Seq_41	GGGATTGACTTGTACAGCTCGT

Таблица 4. Праймеры для введения сайтов рестрикции в ген GFP

GFP_F	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTG
GFP_R	CTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAGAGTGATC
GFP_F_BamHI	AAAAAAGGATCCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTG
GFP_R_HindIII	AAAAAAAAGCTTCTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAGAGTGATC
GFP_F_EcoRI	AAAAAAGAATTCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTG
GFP_R_BamHI	AAAAAAGGATCCCTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAGAGTGATC

Таблица 5. Олигонуклеотиды для сборки гена T5 экзонуклеазы методом PCA

T5_exo_1	AGGACTTAATTAATAATGAGTAAATCCTGGGGAAAA
T5_exo_2	ACGACGGGAAGCCATTTACAGTTCCTCTTCTTCAATAAATTTTCCCAGGATTTACTCAT
T5_exo_3	ATGGCTTCCCCTCGTAATCTAATGATTGTGCGATGGAACCTTAGGCTTTTCGCT
T5_exo_4	ACTTGAGGCAAAATGGTTTTTACTATTGTTATGTTTGAAGCGAAAGCCTAAGTTAGT
T5_exo_5	AAAACCATTTGCCTCAAGTTATGTTTCAACTATTCAATCTCTGGCAAAATCCTACTCT
T5_exo_6	CGGATTTTCCCTTATCACCTAGAACAAATCGTAGTTCTGGCAGAGTAGGATTTTGCCAGAG
T5_exo_7	AGGTGATAAGGGAAAAATCCGATTTTCGTCTAGAACATCTACCAGAG
T5_exo_8	CGTACGTTGTGCGTACTTTTCATCACGATTACCTTTATACTCTGGTAGATGTTCTAGACG
T5_exo_9	AGTACGCACAACGTACGGAAGAGGAGAAAGCGCTAGATGAGCAG
T5_exo_10	AGTTTTACACAACCTCGAAAGCATCCTCAAATACTCAAAGAACTGCTCATCTAGCGCT
T5_exo_11	GCTTTCGAGTTGTGTA AAAACTACATTCCTCAACTTTTACCATTCTGGTGTAGAAGCAG
T5_exo_12	AGATGCCCGATGAGCTTAACAATATAAGCTGCCATATCGTCTGCTTCTACACCACGAA
T5_exo_13	AGCTCATCGGGCATCTTTATGATCACGTTTGGCTAATATCTACAGATGGTACTGGGA
T5_exo_14	AAAACGAGAACTTTATCCGTTAATAAAGTATCCCAGTCAACATCTGT
T5_exo_15	ACGGATAAAGTTTCTCGTTTTTCTTTCACAACACGTCGTGAGTATCATCTTCGTGA
T5_exo_16	AACTGCTCAACATCATCAACATTATGATGTTTCATACATATCACGAAGATGATACTCACG
T5_exo_17	GTTGATGATGTTGAGCAGTTTATCTCCCTGAAAGCAATTATGGGAGA
T5_exo_18	GCTCCTATTCCTCAACACCACGAATATTATCTCTAGATCTCCATAATTGCTTTCAGG
T5_exo_19	GGTGTGAAGGAATAGGAGCAAAACGCGGATATAATATTATTCGTGAGTTTGGTAACGT
T5_exo_20	CTGCTTTCAGGCAGTGGAAGCTGATCAATAATATCCAGTACGTTACCAAATCACGAAT
T5_exo_21	ACTGCCTGGAAAGCAGAAATATATACAGAACCTGAATGCATCGGAAGAACTGCTTTTCC
T5_exo_22	ATCCACACAGTAGGTAGGTAATCAACCAGAATCAAGTTTCGGAAAAGCAGTTCTTCCGA
T5_exo_23	ACCTACCTACTGTGTGGATGCTATTGCTGCTGTAGGTCAAGATGTGTTAGATAAGT
T5_exo_24	TCATTGTTCTGCAATCTCCAAAATATCTTTTGTAAACTTATCTAACACATCTTGACCT

Таблица 6. Праймеры для введения сайтов рестрикции в ген T5 экзонуклеазы

T5exo_F_BamHI	AAAAAAGGATCCAGGACTTAATTAATAATGAGTAAATCCTG
T5exo_F_EcoRI	AAAAAAGAATTCAGGACTTAATTAATAATGAGTAAATCCTG
T5exo_R_BamHI	AAAAAAGGATCCCTCATTGTTCTGCAATCTCCAAA
T5exo_R_HindIII	AAAAAAAAGCTTTCATTGTTCTGCAATCTCCAAA

Таблица 7. Праймеры M13

M13_F	GTTGTA AACGACGGCCAGTG
M13_R	AGCGGATAACAATTTACACAGGA

## **2.2. Подбор, синтез и выделение олигонуклеотидов**

### **2.2.1. Подбор последовательностей олигонуклеотидов**

Для разбиения последовательности гена на набор олигонуклеотидов использовали программу DNABWorks: <https://hpcwebapps.cit.nih.gov/dnaworks/> и программу GeneCut: <http://genecut.unipro.ru/>. Олигонуклеотиды были подобраны с учетом следующих критериев:

1. Близость значений температур плавлений целевых комплексов, формируемых между олигонуклеотидами, к величине 60 °С;
2. Минимальное количество нецелевых дуплексов;
3. Минимальное количество вторичных структур (шпилек) в составе отдельно взятых олигонуклеотидов.
4. Максимальная удаленность значений температур плавлений целевых комплексов от температур плавления наиболее стабильных из нецелевых комплексов и одноцепочечных вторичных структур;

### **2.2.2. Синтез олигонуклеотидов**

Олигонуклеотиды были синтезированы с помощью стандартного твердофазного амидофосфитного способа.

В случае ЛСБ и ООО Биоссет синтез проводился с использованием планшетного синтезатора АСМ-2000 (Биоссет, Россия). Для синтеза олигонуклеотидов был использован набор стандартных амидофосфитных мономеров (Glen Research, США). В качестве полимерного носителя использовался универсальный полимерный носитель СРG с пористостью 500 А (Glen Research, США). Для приготовления водных растворов использовали деионизованную воду квалификации mQ с удельным сопротивлением 18 МΩ/см. Точные параметры синтеза для олигонуклеотидов прочих производителей неизвестны.

В случае олигонуклеотидов Биоссет для очистки методом ОФ-ВЭЖХ при синтезе сохраняли диметокситритильную защиту на 5'-конце олигонуклеотида. В случае всех остальных олигонуклеотидов диметокситритильная защита на 5'-конце при синтезе удалялась.

### **2.2.3. Очистка олигонуклеотидов**

Очистку олигонуклеотидов проводили с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе «Agilent 1200 Series» со скоростью 1,5 мл/минуту с использованием колонки Zorbax Eclipse 18 (Agilent Technologies, США) с

обращенной фазой C18 (ОФ-ВЭЖХ) в градиенте ацетонитрила от 0 до 50 % за 30 минут. Наличие целевой фракции определяли по характерному пику поглощения на 260 нм на 18-22 мин элюции.

После сбора целевых фракций олигонуклеотидов при очистке методом ВЭЖХ раствор количественно переносили в круглодонную колбу, упаривали на ротационном испарителе, затем растворяли в 500 мкл H<sub>2</sub>O mQ, осаждали 10-кратным избытком по объему раствора 2% LiClO<sub>4</sub> в ацетоне. Осадок промывали ацетоном, затем сушили на воздухе при 37 °С. Осадок олигонуклеотидов растворяли в 20 мкл H<sub>2</sub>O mQ и добавляли 80 мкл ледяной уксусной кислоты, для снятия тритильной защиты, перемешивали 5 минут при комнатной температуре, осаждали раствором 2% LiClO<sub>4</sub> в ацетоне, затем растворяли осадок в 80 мкл 0,1 М раствора Трис-НСl (рН 7.4), переосаждали 2% раствором LiClO<sub>4</sub> в ацетоне, промывали ацетоном, затем сушили на воздухе при 37 °С.

Гомогенность выделенных олигонуклеотидов анализировали с помощью электрофореза в ПААГ в денатурирующих условиях (15 % ПААГ, АА:БАА 29:1, 8 М мочевины).

Концентрацию водных растворов олигонуклеотидов определяли спектрофотометрически (спектрофотометр Shimadzu 2100, Япония) с использованием стандартных величин молярного поглощения динуклеотидов при длине волны 260 нм.

### **2.3. Сборка и выделение синтетической геной конструкции**

#### **2.3.1. Сборка методом РСА**

Ферментативную сборку гена из набора олигонуклеотидов (табл. 1,2,3,5) методом РСА проводили в два этапа. На первом этапе проводили «сборочную» ПЦР1, где из смеси всех олигонуклеотидов собирался целевой продукт, а также, образуются побочные и промежуточные продукты. После проведения первого этапа отбирали аликвоту из смеси после ПЦР1 для проведения ПЦР2 с концевыми праймерами (табл. 4,6). Для ПЦР1 и ПЦР2 проводили оптимизацию условий сборки, а именно, количества циклов в ПЦР1 и ПЦР2 (20-30 и 25-35 циклов соответственно), температуры отжига олигонуклеотидов в ПЦР1 (55-65 °С) и праймеров в ПЦР2 (60-70 °С), концентрации Mg<sup>2+</sup> (1,5-3,25 мМ), дНТФ (0,2-1 мМ) и полимеразы (0,02-0,04 е.а./мкл) в ПЦР1. Использовали полимеразы Phusion® High-Fidelity ДНК-полимераза (New England Biolabs, США) и Фьюжн ДНК-полимераза Pfu-Sso7d (Биолабмикс, Россия). Состав буферов не раскрывается производителями, за исключением концентрации Mg<sup>2+</sup>. Наиболее оптимальными условиями считали те, при которых в ПЦР2 образуется наименьшее возможное количество побочных продуктов.

Получили следующие оптимальные условия сборки, где  $t$  – температуры отжига, при ПЦР1 и ПЦР2:

Сборка с ДНК-полимеразой Phusion® High-Fidelity (NEB, США)

реакционная смесь ПЦР1: объём 20 мкл

- ДНК-полимераза Phusion® High-Fidelity (NEB, США): 0,025 е.а./мкл
- дНТФ: 1мМ
- Буфер Phusion® GC 1x, с добавлением  $Mg^{2+}$  до 1,5мМ
- Концентрация каждого из олигонуклеотидов  $1E-07M$

Программа ПЦР1

95 °С 5 мин; 25 циклов 95 °С 20 сек,  $t_1$  °С 20 сек, 72 °С 1 мин; 72 °С 5 мин

реакционная смесь ПЦР2: объём 20 мкл

- ДНК-полимераза Phusion® High-Fidelity (NEB, США): 0,02 е.а./мкл
- дНТФ: 0,2мМ
- Буфер Phusion® GC 1x
- Концентрация каждого из праймеров  $5E-07M$
- В качестве матрицы 1 мкл реакционной смеси ПЦР1

Программа ПЦР2

95 °С 5 мин; 30 циклов 95 °С 20 сек,  $t_2$  °С 20 сек, 72 °С 1 мин; 72 °С 5 мин

Сборка с ДНК-полимеразой Pfu-Sso7d (Биолабмикс, Россия)

реакционная смесь ПЦР1: объём 20 мкл

- ДНК-полимераза Pfu-Sso7d (Биолабмикс, Россия): 0,05 е.а./мкл
- дНТФ: 1мМ
- Буфер ДНК-полимеразы Pfu-Sso7d, с добавлением  $Mg^{2+}$  до 3,25мМ
- Концентрация каждого из олигонуклеотидов  $1E-07M$

Программа ПЦР1

95 °С 5 мин; 25 циклов 95 °С 20 сек,  $t_1$  °С 20 сек, 72 °С 1 мин; 72 °С 5 мин

реакционная смесь ПЦР2: объём 20 мкл

- ДНК-полимераза Pfu-Sso7d (Биолабмикс, Россия): 0,04 е.а./мкл
- дНТФ: 0,2мМ
- Буфер ДНК-полимеразы Pfu-Sso7d 1x
- Концентрация каждого из праймеров  $2E-07M$
- В качестве матрицы 1 мкл реакционной смеси ПЦР1

Программа ПЦР2

95 °C 5 мин; 30 циклов 95 °C 20 сек, t<sub>2</sub> °C 20 сек, 72 °C 1 мин; 72 °C 5 мин

Далее в оптимальных условиях проводили препаративную наработку. Полученную реакционную смесь пересаждали изопропанолом.

### **2.3.2. Сборка методом LCA**

Перед сборкой смесь олигонуклеотидов обрабатывали Полинуклеотидкиназой T4 (Thermo Fisher Scientific, США), для присоединения фосфата на 5'-конец олигонуклеотидов. Реакцию проводили в следующих условиях: объём реакции 50 мкл, буфер T4 полинуклеотид киназы (New England Biolabs, США) 1x, дАТФ 1мМ, T4 полинуклеотид киназа (New England Biolabs, США) 0,2 е.а./мкл, концентрация каждого из олигонуклеотидов 1Е-07М. Ферментативную сборку гена из набора олигонуклеотидов методом LCA проводили в два этапа. На первом этапе проводили непосредственно лигазную сборку при помощи термостабильной лигазы HiFi Taq DNA Ligase (New England Biolabs, США), где из смеси всех олигонуклеотидов собирался целевой продукт, а также, образуются побочные и промежуточные продукты. Далее, отбирали аликвоту из смеси после лигазной сборки для проведения амплификации с концевыми праймерами. Для этапов лигазной сборки и амплификации проводили оптимизацию условий сборки, а именно, количества циклов (20-30 циклов) и температуры отжига (55-65 °C). Наиболее оптимальными условиями считали те, при которых образуется наименьшее возможное количество побочных продуктов.

Получили следующие оптимальные условия сборки

- Объём реакционной смеси 30 мкл
- Taq DNA Ligase (NEB, США) 1,3 е.а./мкл
- Буфер Taq DNA Ligase (NEB, США) 1x
- Концентрация каждого из олигонуклеотидов 8,6Е-08М

Программа лигирования: 95 °C 1 мин; 30 циклов 95°C 30 сек, 58 °C 90 сек.

После лигирования проводили ПЦР в условиях, аналогичных ПЦР2 для сборки РСА с данным набором олигонуклеотидов.

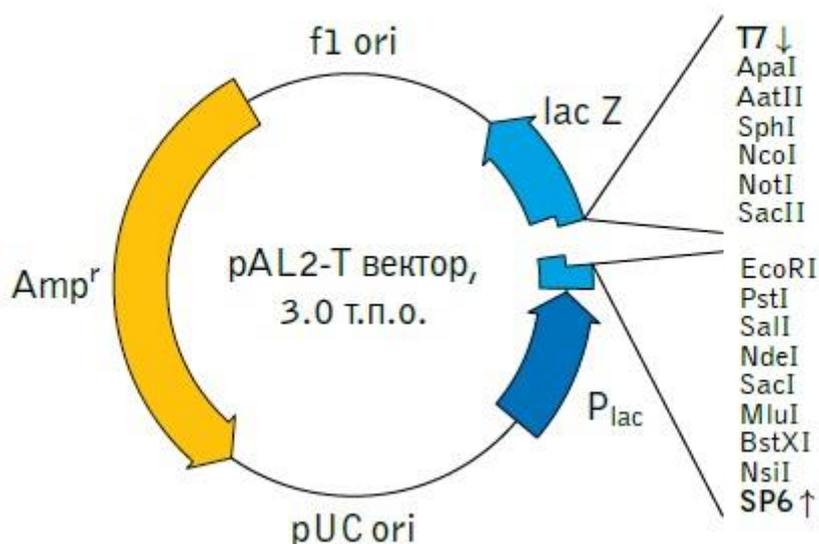
Далее в оптимальных условиях проводили препаративную наработку. Полученную реакционную смесь пересаждали изопропанолом.

## **2.4. Клонирование и трансформация синтетической генной конструкции**

### **2.4.1. Клонирование генной конструкции в вектор pAL2-T**

Перед встройкой в плазмиду ПЦР-продукт обрабатывали Таq-полимеразой для достройки нависающих 3' А-концов. Условия реакции: буфер 1x биолабмикс, Mg<sup>2+</sup> 2мМ, дАТФ 0,2мМ, Таq-полимерза 0,1е.а. ДНК 800нг; температуры: 95 °С 2мин, 72 °С 20 мин. Далее реакцию смесь переосаждали изопропанолом. Выделенный ПЦР-продукт встраивали в вектор рAL2-T согласно протоколу ([http://evrogen.ru/products/pAL-TA/Cloning\\_vectors.shtml](http://evrogen.ru/products/pAL-TA/Cloning_vectors.shtml)) по нависающим однонуклеотидным А-концам ПЦР-продукта и липким Т-концам линейризованного двуцепочечного вектора (рис. 1):

### Карта вектора и структура полилинкера



**Рис. 1.** Карта вектора рAL2-T. Рисунок взят из <http://evrogen.ru/kit-user-manuals/pAL2-T.pdf>

## 2.4.2. Клонирование генной конструкции в плазмиду рUC19

### 2.4.2.1. Гидролиз плазмиды

На реакцию брали: 5 мкг плазмиды рUC19, 20 е.а. эндонуклеазы рестрикции, объём реакционной смеси 40 мкл.

Инкубировали в течение 1 часа при 37 °С, инактивировали в течении 20 минут при 80 °С, чтобы избежать неспецифического гидролиза.

### 2.4.2.2. Дефосфорилирование вектора

К 20 мкл смеси после рестрикции добавляли 10 е.а. термолабильной щелочной фосфатазы (Сибэнзим), инкубировали 10 минут при 37 °С, инактивировали фермент 5 минут при 75 °С.

### **2.4.2.3. Лигирование**

Для лигирования брали 500 нг вектора и трёхкратный мольный избыток вставки, лигаза T4 Сибэнзим 200 е.а. Объём реакционной смеси 20 мкл. Инкубировали в течение 24 часов при +4 °С, инактивировали в течение 10 минут при 65 °С согласно протоколу <https://sibenzyme.com/protocol-t4-dna-ligaze/>.

### **2.4.3. Приготовление электрокомпетентных клеток**

На чашку Петри без антибиотика засеивали суспензию клеток *E. coli* штамма NovaBlue и инкубировали ночь при +37 °С. Одну колонию скалывали в 3 мл среды LB и инкубировали ночь при +37 °С и перемешивании. Полученные 3 мл культуры добавляли к 125 мл среды LB и инкубировали при +37 °С и перемешивании до оптической плотности 0,4-0,6 ОЕ на длине волны 600 нм. Все дальнейшие работы проводили во льду или при +4 С. Центрифугировали в 4 пробирках на 50 мл, по 30 мл в каждой 15 мин при 4000 g. Удаляли супернатант, добавляли 120 мл 10% раствора глицерина и растворяли осадок. Центрифугировали в 4 пробирках на 50 мл, по 30 мл в каждой 15 мин при 4000 g. Удаляли супернатант, добавляли 60 мл 10% раствора глицерина и растворяли осадок. Центрифугировали в 2 пробирках на 50 мл, по 30 мл в каждой 15 мин при 4000 g. Удаляли супернатант, добавляли 6 мл 10% раствора глицерина и растворяли осадок. Центрифугировали в 2 пробирках на 50 мл, по 3 мл в каждой 15 мин при 4000g. Растворяли осадок в 2 мл 10% раствора глицерина и расфасовывали по 100 мкл. Приготовленные электрокомпетентные клетки *E. coli* штамма NovaBlue хранили при -80°С до момента использования.

### **2.4.4. Трансформация электрокомпетентных клеток, наработка клонов**

Смешивали 1 мкл охлажденной лигазной смеси с суспензией электрокомпетентных клеток *E. coli* NovaBlue на льду в суммарном объёме 100 мкл; помещали смесь в предварительно охлаждённую кювету для электропорации (Bio-Rad Laboratories, США, ширина 1 мм). Проводили электропорацию при напряжении 1,6 кВ, сопротивлении 800 Ом и ёмкости конденсатора 25 мкФ. Сразу после разряда переносили суспензию трансформированных клеток из кюветы в пробирку с 1 мл LB-среды, предварительно нагретой до 37 °С. Инкубировали 1 час при 37 °С. Центрифугировали 5 мин при 3000 g. Удаляли супернатант, оставляя 50 мкл среды. Ресуспендировали осадок клеток в 50 мкл среды и наносили на чашку Петри с LB-агаром; инкубировали сутки при 37 °С.

### **2.4.5. Характеризация плазмид, выделенных из клонов**

#### **2.4.5.1. Скрининг колоний**

В пробирки на 1,5 мл помещали по 50 мкл H<sub>2</sub>O mQ; стерильным наконечником автоматической пипетки переносили белые колонии с чашки Петри в пробирки с H<sub>2</sub>O mQ; клетки ресуспендировали пипетированием. ПЦР с внешними праймерами M13 (табл. 7) проводили с Taq-полимеразой (Biolabmix, Россия) в рекомендованных для данной полимеразы условиях. Программа ПЦР: 95 °С 5 мин; 30 циклов: 95 °С 20 сек, 56 °С 30 сек, 72 °С 90 сек; 72 °С 5 мин. В качестве матрицы брали 1 мкл суспензии клеток. Определение длины ПЦР фрагментов проводили электрофоретически в 1,5% агарозном геле.

#### **2.4.5.2. Выделение плазмидной ДНК из наработанных культур**

Клоны, содержащие вставку целевой длины, нарабатывали следующим образом: в пробирки ёмкостью 25 мл помещали 3 мл LB, 3 мкл ампициллина 100 мкг/мл, 50 мкл водной суспензии клона белого цвета, отобранного после трансформации компетентных клеток *E. coli* плазмидой, содержащей вставку гена. Инкубировали при 37 °С в термомиксере при перемешивании со скоростью 500 об/минуту в течение суток.

Выделение плазмидной ДНК из наработанной культуры проводили методом щелочного лизиса (Maniatis et al., 1984). Поэтапно осаждали 3 мл культуры центрифугированием в течение 5 минут при 3000 g в пробирках ёмкостью 1,5 мл, после чего удаляли супернатант; добавляли 200 мкл буфера 1, ресуспендировали пипетированием; добавляли 200 мкл буфера 2, аккуратно перемешивали переворачиванием до просветления раствора; добавляли 200 мкл буфера 3, перемешивали переворачиванием до прекращения выпадения осадка; добавляли 50 мкл хлороформа; перемешивали на вортексе, оставляли при комнатной температуре 5 минут; центрифугировали 15 минут при 12000 g; переносили водную фракцию в отдельную пробирку, осаждали ДНК изопропанолом, растворяли осадок в 50 мкл воды mQ; добавляли 3 мкл РНКазы 10 мг/мл (Биолабмикс, Россия); инкубировали 1 час при 37 °С.

К 53 мкл раствора ДНК после обработки РНКазой добавляли 50 мкл хлороформа и 50 мкл фенола, уравновешенного TE (рН 8.0), перемешивали на вортексе; центрифугировали 10 минут при 12000 g; отбирали верхнюю (водную) фазу и добавляли к ней 50 мкл хлороформа; перемешивали на вортексе; центрифугировали 5 минут при 12000 g; собирали верхнюю (водную) фазу и осаждали ДНК изопропанолом; растворяли осадок в 50 мкл воды mQ. Чистоту и гомогенность выделенных плазмид оценивали электрофоретически в 1,5% агарозном геле. Концентрацию плазмидной ДНК определяли спектрофотометрически.

### **2.4.5.3. Секвенирование по Сэнгеру**

Для секвенирования участков плазмид с целевой вставкой проводили амплификацию этих участков с праймерами M13. Амплификацию проводили с Фьюжн ДНК-полимеразой Pfu-Sso7d, в рекомендованных условиях. Программа ПЦР 95 °С 5 мин; 30 циклов: 95 °С 20 сек, 56 °С 30 сек, 72 °С 30 сек; 72 °С 5 мин. Полученные ПЦР-фрагменты очищали на магнитных частицах и растворяли в воде Mq. Чистоту и гомогенность выделенных ПЦР фрагментов оценивали электрофоретически в 1,5% агарозном геле. Концентрацию ДНК определяли спектрофотометрически.

Для проведения единичной реакции секвенирования использовали: 1,5 мкл терминатора («Nimagen»); 6 мкл буфера («Nimagen»); 2 мкл 10 мкМ праймера M13; 500 фмоль ДНК; объём реакционной смеси 30 мкл.

После проведения реакции реакционную смесь осаждали 60% изопропанолом и высушивали. Анализ реакционных смесей проводили в ЦКП «Геномика» ИХБФМ СО РАН с использованием капиллярного секвенатора Applied biosystems 3100.

### **2.4.5.4 Анализ данных секвенирования по Сэнгеру для определения встречаемости ошибок в целевой генной конструкции**

Для идентификации ошибок и расчета статистической информации по типам и количеству ошибок в составе плазмидных ДНК, которые были секвенированы, был написан скрипт с использованием языка Python.

Прочтения, полученные при секвенировании методом Сэнгера, были выровнены на референсную последовательность GFP с использованием алгоритма MAFFT с помощью программы Ugene Unipro (Okonechnikov et al., 2012). С помощью скрипта проводили сравнение полученных последовательностей с референсной последовательностью. При возникновении несоответствия с референсной последовательностью определяли тип ошибки (замена, делеция, или инсерция) и в дальнейшем подсчитывали число ошибок каждого типа.

## **2.4.6 Характеризация последовательностей синтетических олигонуклеотидов**

### **2.4.6.1 Элонгация олигонуклеотидов с помощью фрагмента Клёнова**

Реакцию проводили в следующих условиях: 0,03 ОЕ двух олигонуклеотидов, 5 мкл буфера для фрагмента Клёнова «СибЭнзим» (10-кратный), 0,2 мМ дНТФ, объём реакционной смеси 50 мкл. Инкубировали реакционную смесь 3 минуты при 95 °С; 5 минут при 50 °С; добавляли 0,5 мкл 5 е.а./мкл фрагмента Клёнова ДНК-полимеразы I *E. coli* «СибЭнзим». Инкубировали 1 час при 37 °С, инактивировали фермент 10 минут при 75 °С.

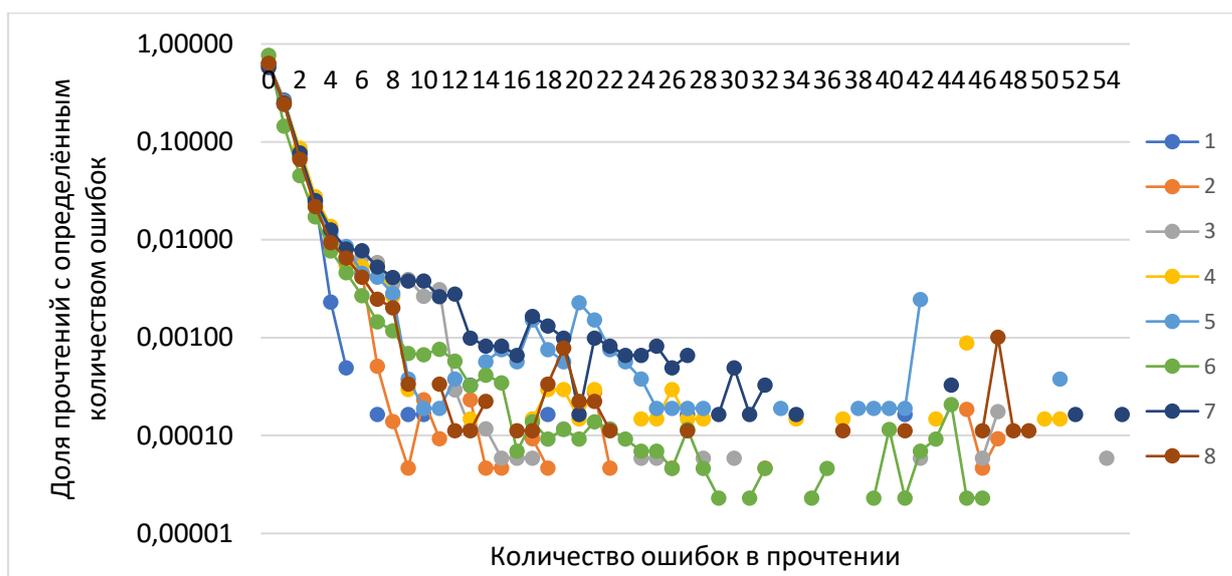
#### **2.4.6.2 Секвенирование комплексов олигонуклеотидов методом NGS**

Секвенирование методом NGS проводили в ЦКП «Геномика» на приборе Illumina MiSeq при длине прочтений 2\*150 нт. Предварительно пары олигонуклеотидов достраивали до тупых концов фрагментом Клёнова ДНК-полимеразы I *E. coli*. Далее к полученным фрагментам ДНК длиной около 100 нт присоединяли адаптеры. Из реакционной смеси методом гель-электрофореза выделяли фракцию ДНК длиной 120 нт. Для этого из нативного акриламидного геля вырезали фрагмент, содержащий ДНК целевой длины. Визуализацию ДНК проводили окрашиванием геля бромистым этидием. Полученный фрагмент геля измельчали и инкубировали в 2мл воды mQ при 37 °С и перемешивании 1500 об/мин в течение суток. Далее центрифугировали смесь на 11000g 10 мин, отделяли супернатант и осаждали ДНК этанолом. Полученную фракцию ДНК наносили на чип для секвенирования. Приготовление библиотек для секвенирования комплексов олигонуклеотидов и последующий запуск прибора проводил сотрудник ЦКП «Геномика» Тупикин А.Е.

#### **2.4.6.3 Анализ данных NGS**

Обработку результатов секвенирования NGS проводили по следующему алгоритму:

С помощью программы Trimmomatic была проведена обрезка адаптеров. Далее с помощью отдельной Python-программы с использованием модулей pysam, re и xlswriter сравнивали прямые и обратные прочтения для каждой колонии. При несовпадении прямого и обратного прочтений в паре данную пару прочтений исключали из статистической обработки. Каждое прочтение сравнивали с референсной последовательностью, соответствующей прямой и обратной цепям комплекса, и подсчитывали число ошибок в прочтении. Прочтения, содержащие более 10 ошибок, составляли незначительную часть от всех прочтений (рис 2), однако при подсчёте числа ошибок различных типов могли внести значительный вклад в распределение ошибок, поэтому в дальнейшем такие прочтения исключались из статистической обработки. Среди прочтений, содержащих менее 10 ошибок, подсчитывали число ошибок каждого типа во всех прочтениях, а также число правильных прочтений. Python-программа для расчёта статистики была написана, а также расчёт при помощи программы Trimmomatic и Python-программы для расчёта статистики проводился сотрудником лаборатории фармакогеномики Кечиным А. А.



**Рис.2.** Распределение доли прочтений от количества ошибок в прочтении

## 2.4.7. Обработка мисматч-распознающими ферментами

### 2.4.7.1. Обработка корректазой

Условия реакции: ДНК – 3600 нг на реакцию, корректаза (Thermo Fisher Scientific, США) 1 мкл, буфер 10-кратный 1 мкл. Объём реакционной смеси 10 мкл. Температурная программа: 5 минут при 98 °С, 10 минут при комнатной температуре, ставили на лёд, добавляли фермент, инкубировали 60 минут при 25°С. Инактивировали добавлением 1 мкл 0,25 М ЭДТА. ПЦР после реакции не проводили.

### 2.4.7.2. Обработка T7 эндонуклеазой I

На реакцию брали 170 нг ДНК. Реакцию проводили в 10 мкл однократного буфера для T7 эндонуклеазы I (NEB, США). Перед добавлением фермента проводили плавление и отжиг по следующей схеме: 95 °С 5 мин; 95→85 -2 °С/сек; 85→25 -0,1 °С/сек. Далее добавляли 10 е.а. T7 эндонуклеазы I, инкубировали 25 °С 1 час, инактивировали при 65 °С 20 мин.

После обработки эндонуклеазой проводили ПЦР в условиях, аналогичных ПЦР2. В качестве матрицы брали 1 мкл реакционной смеси.

## 2.5. Статистическая обработка данных

Оценку значимости изменения количества ошибок проводили, рассчитывая критерий Стьюдента исходя из тетрафорического коэффициента сопряжённости Пирсона. За одно измерение принимали секвенирование одного нуклеотида. Расчёт проводили следующим образом:

Пусть имеются результаты двух секвенирований. По результатам первого секвенирования обнаружено А ошибок и В корректных нуклеотидов. По результатам второго секвенирования обнаружено С ошибок и D корректных нуклеотидов (табл 8).

Таблица 8. Исходные данные для определения значимости различий в результатах секвенирования.

	Секвенирование 1	Секвенирование 2
Ошибок	А	С
Корректных нуклеотидов	В	Д

Тогда тетрафорический коэффициент корреляции рассчитывается как:

$$r = \frac{AD - BC}{\sqrt{(A+B)(C+D)(A+C)(B+D)}}$$

Ошибка репрезентативности коэффициента корреляции рассчитывается по формуле:

$$m_r = \frac{1 - r^2}{\sqrt{N}}$$

Где N это число всех секвенированных нуклеотидов, т.е. N=A+B+C+D

Коэффициент Стьюдента рассчитывали по формуле:

$$t = \left| \frac{r}{m_r} \right|$$

Если полученный Коэффициент Стьюдента превышает значение t-критерия Стьюдента при уровне значимости 0,05, то различия между количеством ошибок считали статистически достоверным. Поскольку секвенированных нуклеотидов во всех экспериментах более 1000, то  $t_{0,05}$  принимали равным 1,96. Ограничением тетрафорического коэффициента корреляции является обязательное выполнение условий: A>5, B>5, C>5, D>5. В и D во всех экспериментах всегда больше 5. А и С не во всех экспериментах получались больше 5, поэтому проверка проводилась только если количество ошибок в каждом из сравниваемых образцов было более 5.

### 3. Результаты и обсуждение

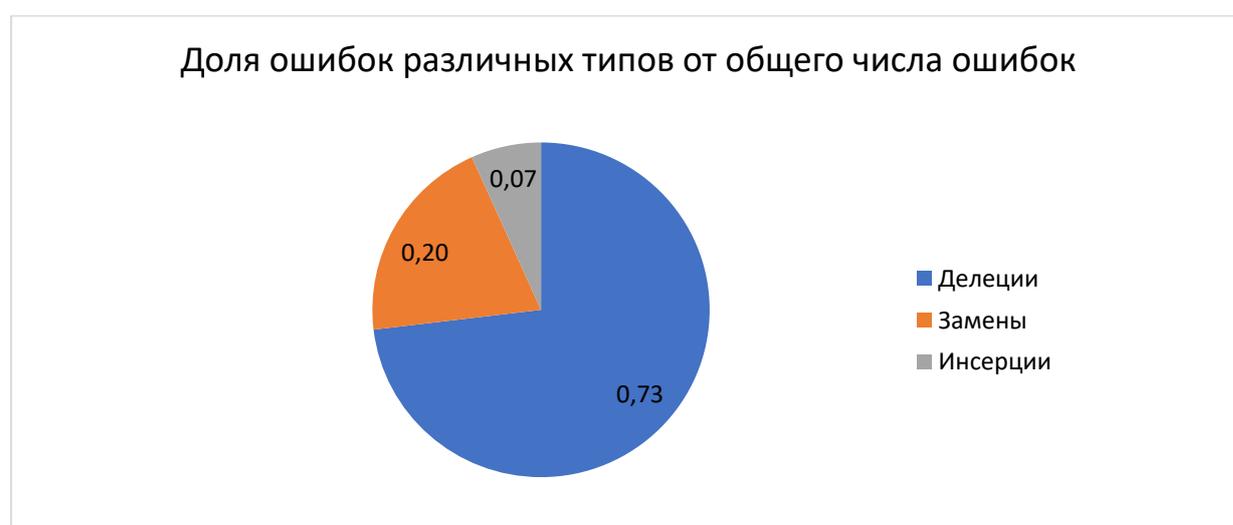
#### 3.1. Отработка методики сборки генов из олигонуклеотидов

На первом этапе работы была проведена отработка методики сборки генных конструкций из олигонуклеотидов. В качестве модельного гена для синтеза была выбрана последовательность гена зеленого флуоресцентного белка GFP, поскольку ген имеет сложную вторичную структуру (согласно mfold <http://www.unafold.org/>) и сравнительно высокий GC состав 61,8%. Таким образом, методики сборки, работающие на столь

сложной для сборки последовательности, заведомо будут эффективны для менее структурированных последовательностей. Последовательность гена была разбита на набор олигонуклеотидов для сборки методом PCA (табл. 1). Для разбиения последовательности на набор олигонуклеотидов использовали программу DNAWorks: <https://hpcwebapps.cit.nih.gov/dnaworks/>. Для получаемых наборов олигонуклеотидов проводили оценку термической стабильности комплексов целевых и нецелевых комплексов между олигонуклеотидами использованием программного пакета Blastn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) и программы Melting4.3 (<https://www.ebi.ac.uk/biomodels-static/tools/melting/>), а также вторичных структур олигонуклеотидов с использованием программного пакета mfold. Данные программные пакеты были выбраны как бесплатные и имеющие необходимый функционал. Была проведена оптимизация условий сборки в ПЦР1 и ПЦР2. Были определены оптимальные температуры отжига в ПЦР1 58°C, в ПЦР2 60°C.

### 3.2. Поиск источника ошибок

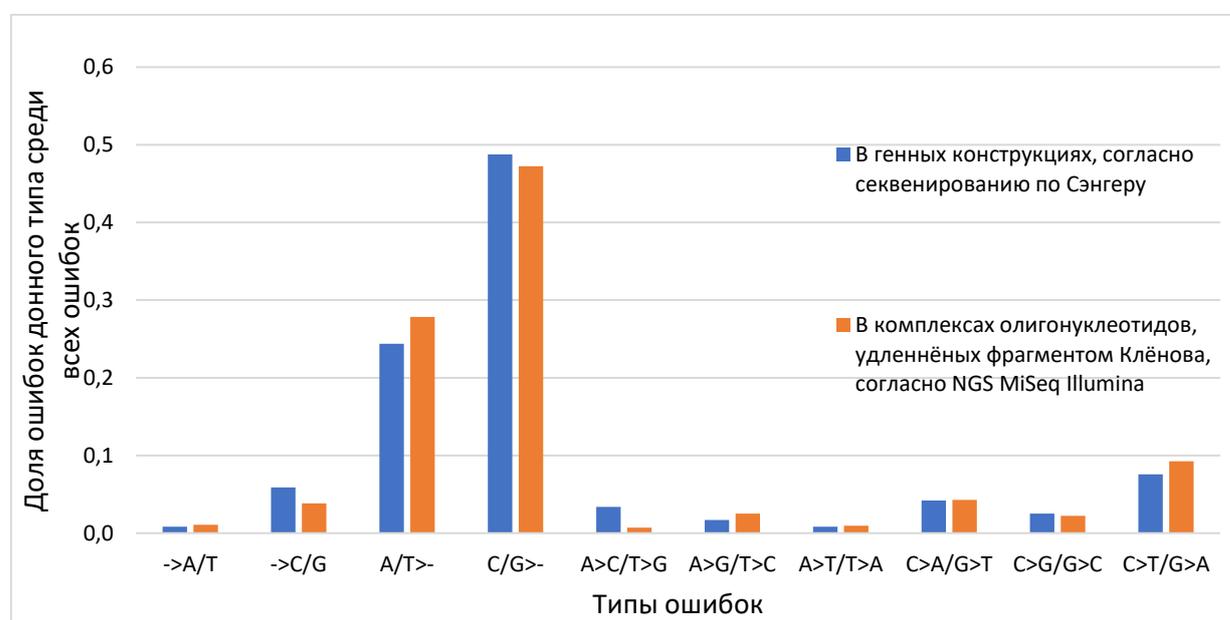
Ген GFP был наработан в препаративных количествах в определённых ранее оптимальных условиях сборки. Полученная генная конструкция была клонирована в плазмиду pAL2-T. Полученной плазмидной конструкцией были трансформированы клетки *E. coli* штамма NovaBlue. Из 32 клонов, содержащих вставку целевой длины, были выделены плазмиды со вставкой. Участки плазмид, содержащие вставку, были секвенированы методом Сэнгера. Было подсчитано соотношение ошибок различных типов (рис. 3).



**Рис. 3.** Доля ошибок различных типов от общего числа ошибок в клонах GFP.

Можно заметить, что основную долю ошибок составляют делеции. Следовательно, наибольший вклад в улучшение точности сборки даст снижение количества делеций.

Для оценки частоты ошибок при синтезе олигонуклеотидов было проведено секвенирование дуплексов, полученных при достройке олигонуклеотидов фрагментом Клёнова. Пары олигонуклеотидов 1-2, 3-4, 5-6, 7-8, 9-10, 11-12, 13-14, 15-16 (табл. 1) были достроены фрагментом Клёнова ДНК-полимеразы I *E. coli* до коротких дуплексов и очищены в ПААГ. Полученные дуплексы были секвенированы методом NGS. Было проведено сравнение структуры ошибок в исходных олигонуклеотидах согласно результатам NGS и в конечных генных конструкциях согласно результатам секвенирования по Сэнгеру (рис. 4). При обнаружении ошибки при секвенировании по Сэнгеру невозможно сказать наверняка, какая из цепей изначально несла ошибку, поскольку до секвенирования проводится ПЦР, и комплементарные цепи многократно достраиваются. В связи с этим ошибки комплементарных нуклеотидов учитывались вместе (например, и «делеция С» и «делеция G» учитывалась как «делеция С или G»).



**Рис. 4.** Доля различных типов ошибок в клонах согласно данным секвенирования по Сэнгеру и в олигонуклеотидах согласно данным NGS.

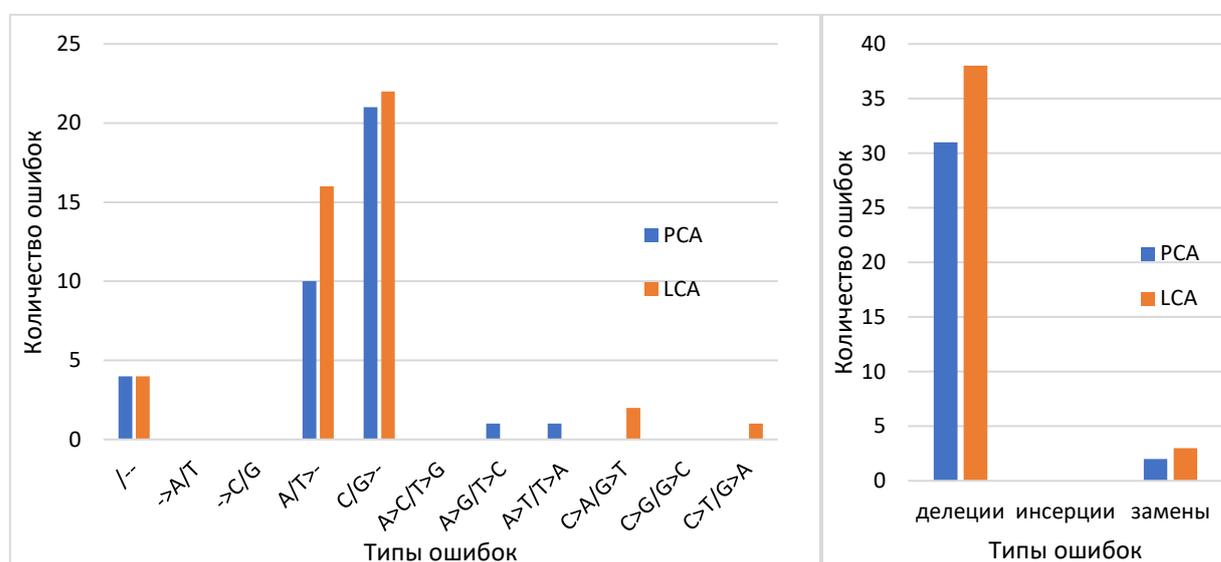
Сравнивая полученные результаты, можно заметить, что типы ошибок в синтезированных генных конструкциях и в исходных олигонуклеотидах схожи. Из этого можно сделать вывод, что наблюдаемые ошибки появляются не при сборке генной конструкции, а при синтезе олигонуклеотидов.

### 3.3. Проверка способов устранения ошибок

Для проверки возможности снижения числа ошибок в собираемой генной конструкции был проведён ряд экспериментов, в которых исследовалось влияние различных факторов на частоту встречаемости ошибок в конечном продукте.

### 3.3.1. Влияние способа сборки на ошибочность собираемых конструкций

Провели проверку влияния способа сборки на ошибочность генных конструкций. Последовательность гена была разбита на набор олигонуклеотидов для сборки методом LCA. Из полученных олигонуклеотидов были собраны фрагменты целевой длины методами PCA и LCA. Условия сборки PCA: полимеразы Phusion® High-Fidelity (NEB, США), температуры отжига в ПЦР1 56 °С, в ПЦР2 60 °С. Полученные генные конструкции были клонированы в плазмиду pUC19 по сайтам рестрикции BamHI и HindIII. Полученными плазмидными конструкциями были трансформированы клетки *E. coli* штамма NovaBlue. Для каждого способа сборки из 10 клонов, содержащих вставку целевой длины, были выделены плазмиды со вставкой. Участки плазмид, содержащие вставку, были секвенированы методом Сэнгера. Было подсчитано количество ошибок каждого типа (рис. 8).

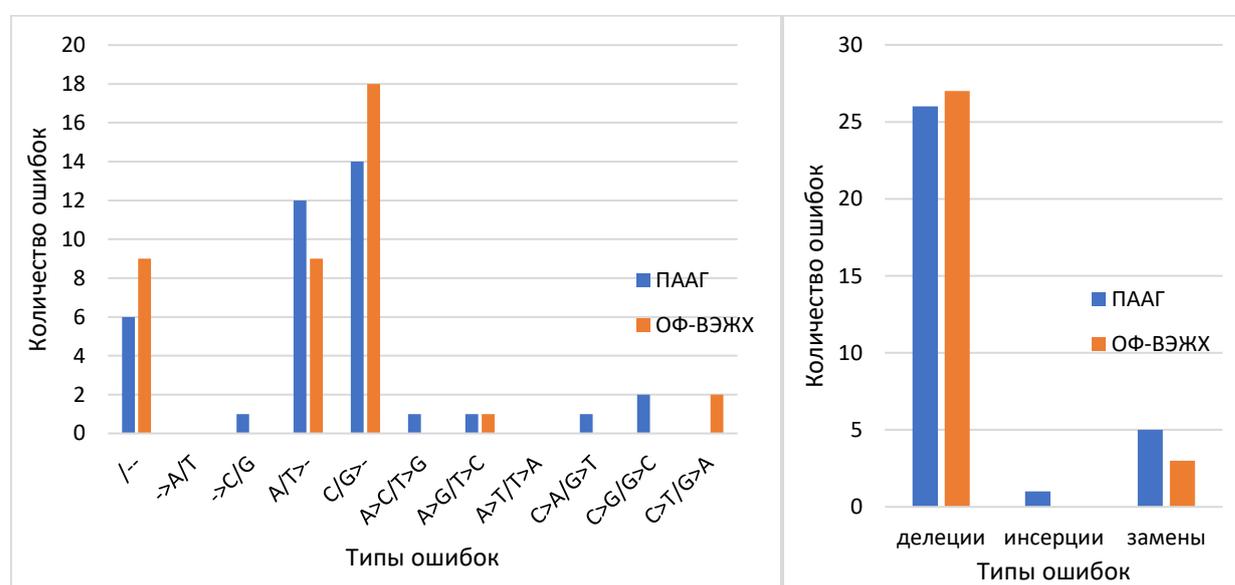


**Рис. 8.** Количество ошибок различных типов в клонах, полученных методами PCA и LCA.

Сравнивая полученные результаты, видно, что различие суммарного количества делеций статистически не значимо ( $t=0,845$ ). Различия количества делеций A/T>- и C/G>- также статистически не значимы ( $t=1,179$  и  $t=0,153$ ). Таким образом, можно заключить, что способ сборки PCA или LCA не оказывает существенного влияния на ошибочность генной конструкции. В то же время, PCA не требует полного покрытия цепи олигонуклеотидами, и не требует наличия дополнительного фермента – термостабильной лигазы. В связи с этим, PCA является более экономичным методом, поэтому далее рассматривали влияние факторов при сборке методом PCA.

### 3.3.2. Влияние способа очистки олигонуклеотидов на ошибочность собираемых конструкций

Провели проверку влияния способа очистки олигонуклеотидов на ошибочность получаемых из них генных конструкций. Олигонуклеотиды для сборки гена GFP были очищены методами ПААГ и ОФ-ВЭЖХ. Из олигонуклеотидов были собраны генные конструкции методом ПСА. Условия сборки: полимеразы Phusion® High-Fidelity (NEB, США), температуры отжига в ПЦР1 58 °С, в ПЦР2 60 °С. Полученная генная конструкция была клонирована в плазмиду pUC19, по сайтам рестрикции BamHI и HindIII. Полученными плазмидными конструкциями были трансформированы клетки *E. coli* штамма NovaBlue. Для каждого типа очистки олигонуклеотидов из 10 клонов, содержащих вставку целевой длины, были выделены плазмиды со вставкой. Участки плазмид, содержащие вставку, были секвенированы методом Сэнгера. Было подсчитано количество ошибок каждого типа (рис. 5).



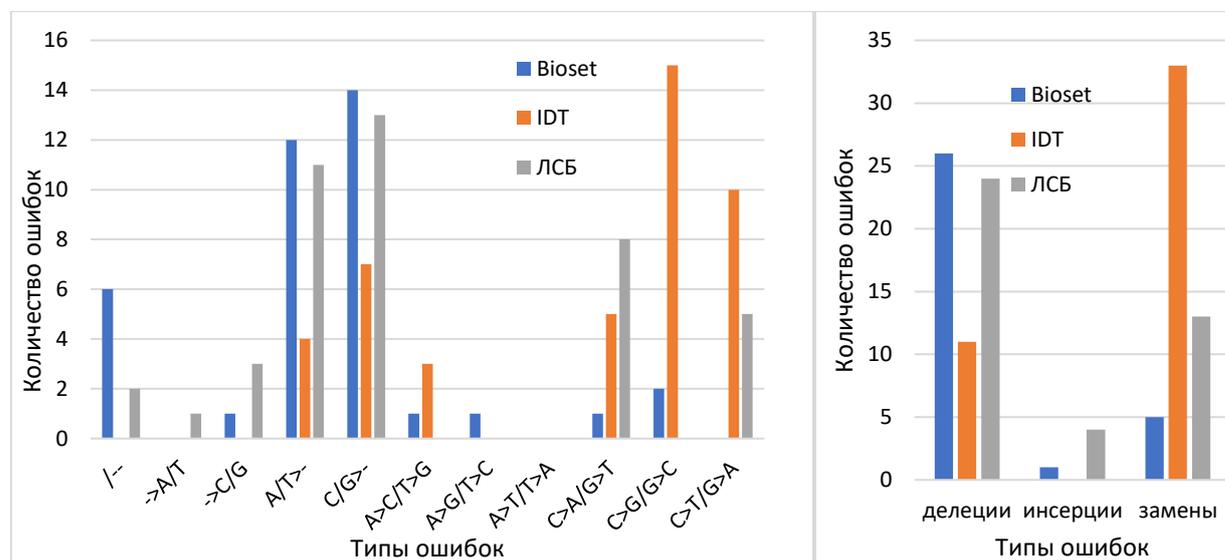
**Рис. 5.** Количество ошибок различных типов в клонах, полученных из олигонуклеотидов, очищенных различными способами.

Сравнивая полученные результаты, можно заметить, что различие суммарного количества делеций статистически не значимо ( $t=0,137$ ). Различия в количестве длинных делеций, а также делеций A/T>- и C/G>- также статистически не значимы ( $t=0,775$ ;  $t=0,656$ ;  $t=0,708$  соответственно). При очистке ПААГ происходит удаление укороченных продуктов синтеза. Тем не менее при достаточно большой длине олигонуклеотидов разделить продукт целевой длины от продукта, укороченного на один нуклеотид, может быть затруднительно. Таким образом, даже после очистки ПААГ в смеси могут оставаться олигонуклеотиды с делециями. При очистке ОФ-ВЭЖХ происходит удаление продуктов, не имеющих 5'-диметокситритильной защитной группы. Такие продукты образуются при кэпировании непрореагировавших 5'-гидроксильных групп. Однако, если 5'-гидроксильная группа на этапе кэпирования не прореагировала, то синтез цепи будет

продолжен, и в итоге получится олигонуклеотид с 5'-диметокситритильной защитной группой, но укороченный на один нуклеотид. Таким образом, ОФ-ВЭЖХ не сможет очистить продукт от укороченных олигонуклеотидов с 5'-диметокситритильной защитной группой. Таким образом, можно заключить что способ очистки олигонуклеотидов не влияет на ошибочность генной конструкции.

### 3.3.3. Влияние производителя олигонуклеотидов и типа синтезатора на ошибочность собираемых конструкций

Провели проверку влияния производителя олигонуклеотидов на ошибочность получаемых из них генных конструкций. Олигонуклеотиды для сборки гена GFP (табл. 1) были получены от трёх различных производителей. Из олигонуклеотидов были собраны генные конструкции методом ПСА. Условия сборки: полимеразы Phusion® High-Fidelity (NEB, США), температуры отжига в ПЦР1 58 °С, в ПЦР2 60 °С. Полученными генными конструкциями были клонированы в плазмиду pUC19, по сайтам рестрикции BamHI и HindIII. Полученными плазмидными конструкциями были трансформированы клетки *E. coli* штамма NovaBlue. Для каждого из производителей олигонуклеотидов из 10 клонов, содержащих вставку целевой длины, были выделены плазмиды со вставкой. Участки плазмид, содержащие вставку, были секвенированы методом Сэнгера. Было подсчитано количество ошибок каждого типа (рис. 6).



**Рис. 6.** Количество ошибок различных типов в клонах, полученных из олигонуклеотидов от различных производителей.

Сравнивая полученные результаты, можно заметить, что различие суммарного количества делеций между Bioset и IDT статистически значимо ( $t=2,47$ ), между IDT и ЛСБ статистически значимо ( $t=2,20$ ), а между Bioset и ЛСБ статистически не значимо ( $t=0,283$ ). Также, есть статистически значимое различие в суммарном количестве замен у IDT и ЛСБ

( $t=2,43$ ). Таким образом, в зависимости от производителя олигонуклеотидов точность синтеза конечных генных конструкций и структура ошибок в них может различаться. Так в олигонуклеотидах IDT преобладают замены, а в олигонуклеотидах Bioset и ЛСБ – делеции. Таким образом, при выборе способа снижения ошибочности необходимо учитывать, какой тип ошибок преобладает в олигонуклеотидах конкретного производителя.

Также провели проверку влияния производителя олигонуклеотидов на долю молекул с корректной последовательностью в исходном пуле олигонуклеотидов. Олигонуклеотиды с последовательностями GFP 13-14 от 8 различных производителей были достроены фрагментом Клёнова ДНК-полимеразы I *E. coli* до коротких дуплексов и очищены в ПААГ. Полученные дуплексы были секвенированы методом NGS. Число пар прочтений, где пара это прямое и обратное прочтение составило от 19421 до 40159 (табл. 9).

Таблица 9. Число пар прочтений NGS при секвенировании олигонуклеотидов от различных производителей.

Биоссет	28163
IDT	22106
ЛХРНК	22085
ЛМХ	19421
Синтол	22660
ДНК-синтез	40159
Люмипроб	27520
Евроген	27522

Была подсчитана доля корректных прочтений в секвенированных дуплексах (рис. 7).

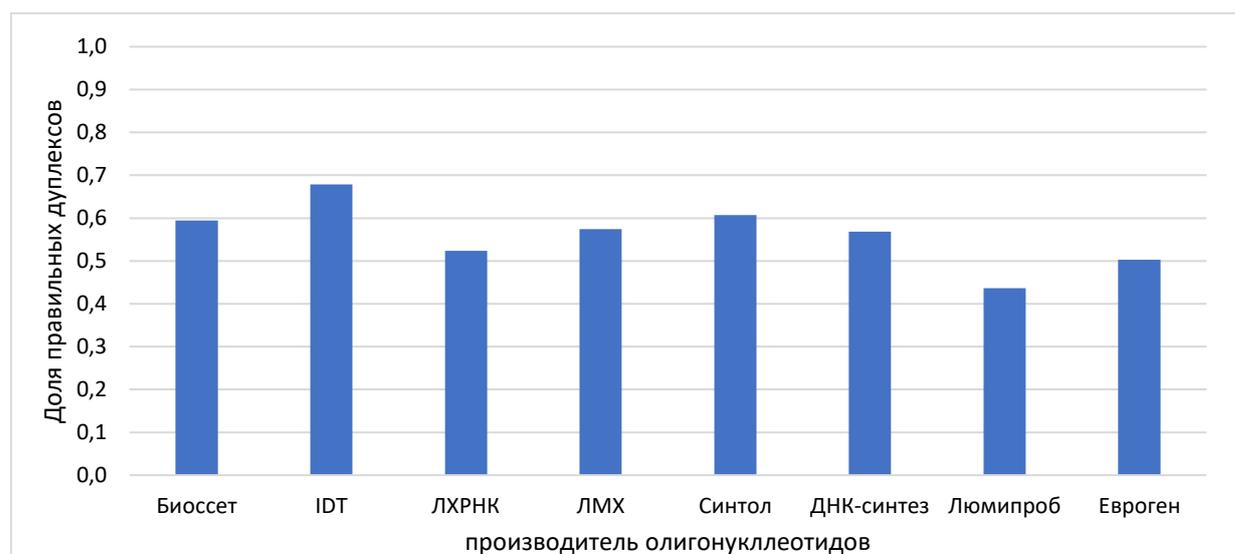
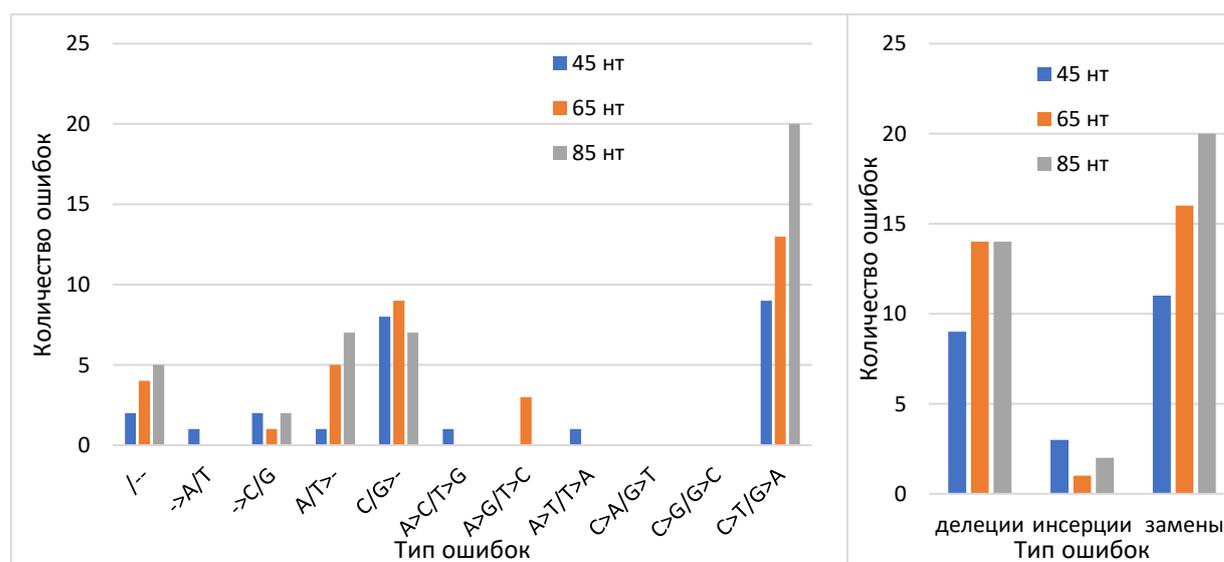


Рис. 7. Доля правильных дуплексов в олигонуклеотидах из 8-и разных источников.

Сравнивая полученные результаты, можно заметить, что доля корректных прочтений существенно различается от производителя к производителю, от 44% до 68%. Таким образом, при использовании олигонуклеотидов для сборки генных конструкций необходимо учитывать точность синтеза исходных олигонуклеотидов. Тем не менее, следует отметить, что на точность синтеза также может влиять последовательность олигонуклеотидов, поэтому, для повышения точности определения ошибочности необходимо будет повторить данный эксперимент, но с другими последовательностями олигонуклеотидов.

### 3.3.4. Влияние длины олигонуклеотидов на ошибочность собираемых конструкций

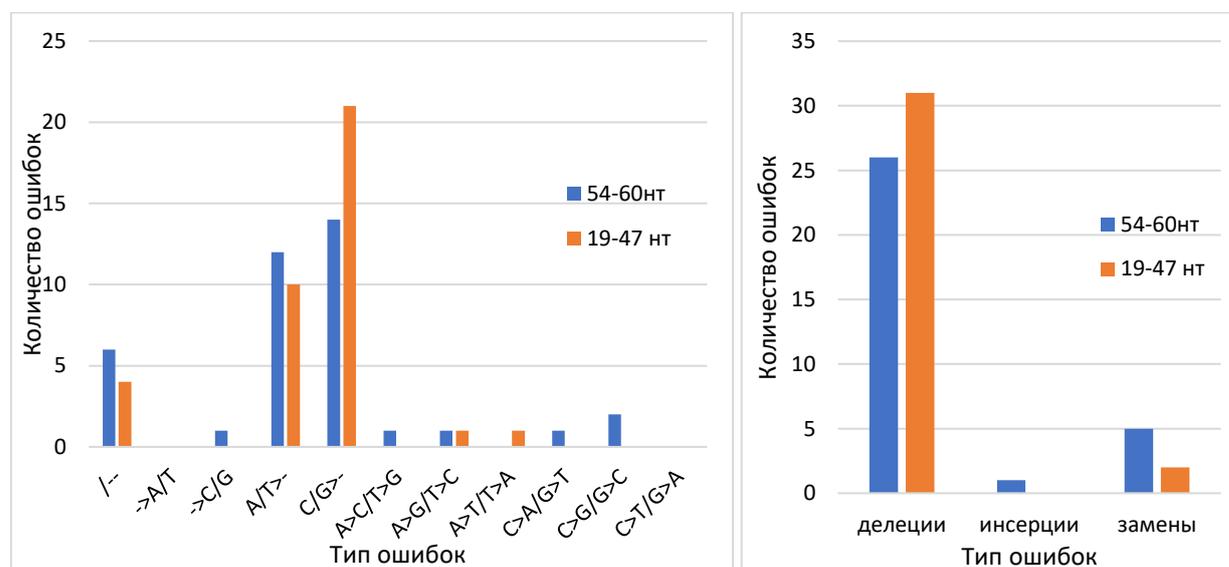
Провели проверку влияния длины исходных олигонуклеотидов на ошибочность генных конструкций. Модельная последовательность длиной 690 нт была разбита на 3 набора олигонуклеотидов длиной до 45 нт (36-45), 65 нт (59-65), 85 нт (68-81) программой GeneCut. Из полученных олигонуклеотидов были собраны фрагменты целевой длины методом ПСА. Условия сборки: полимеразы Phusion® High-Fidelity (NEB, США), температуры отжига в ПЦР1 60°C, в ПЦР2 72 °C. Полученные генные конструкции были клонированы в плазмиду pUC19 по сайтам рестрикции BamHI и HindIII. Полученными плазмидными конструкциями были трансформированы клетки *E. coli* штамма NovaBlue. Для каждого набора олигонуклеотидов из 10 клонов, содержащих вставку целевой длины, были выделены плазмиды со вставкой. Участки плазмид, содержащие вставку, были секвенированы методом Сэнгера. Было подсчитано количество ошибок каждого типа (рис. 9).



**Рис. 9.** Количество ошибок различных типов в клонах, полученных из олигонуклеотидов различной длины.

Сравнивая полученные результаты, можно заметить, что различия в количестве замен C>T/G>A между сборками из олигонуклеотидов длиной 45нт и 85нт статистически значимо ( $t=2,04$ ). Остальные различия статистически незначимы. Таким образом, увеличение длины исходных олигонуклеотидов увеличивает количество замен и делеций. Таким образом, при разбиении на олигонуклеотиды необходимо стремиться к минимизации длины олигонуклеотидов.

Также провели сравнение количества ошибок в ранее полученных генных конструкциях GFP, собранных из олигонуклеотидов различной длины методом PCA (рис. 10). Сравнивали генные конструкции из олигонуклеотидов Bioset очищенных ПААГ (длина 54-60 нт) и олигонуклеотидов Bioset для сборки LCA (длина 19-47 нт).



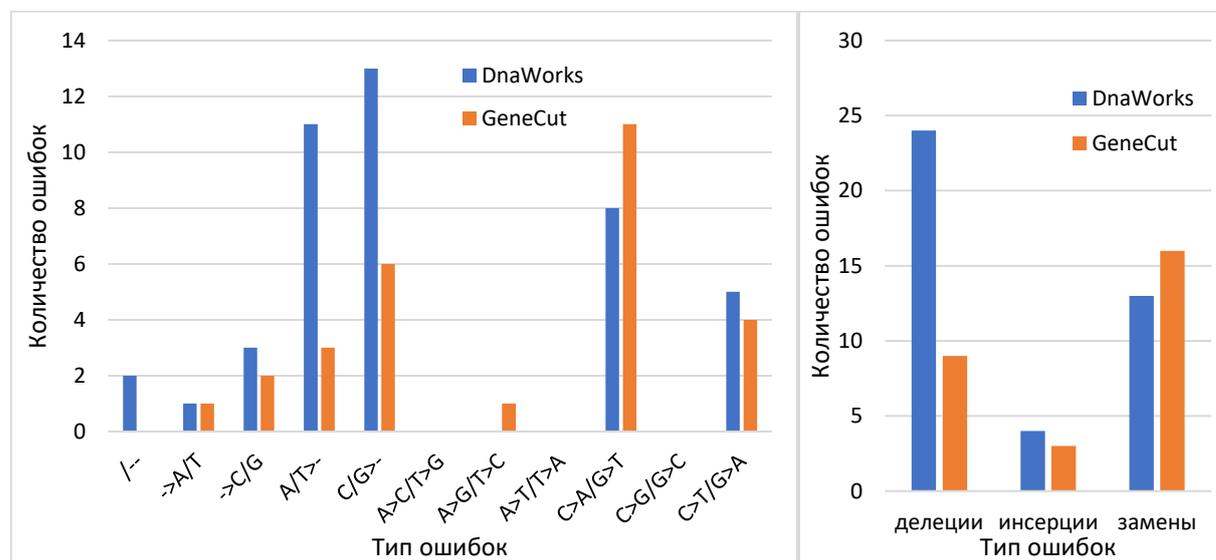
**Рис. 10.** Количество ошибок различных типов в клонах, полученных из олигонуклеотидов, очищенных различным способом.

Сравнивая полученные результаты, можно заметить, Разница в суммарном количестве делеций статистически незначима ( $t=0,549$ ). Разница в количестве делеций A/T>- и C/G>- также статистически не значима ( $t=0,495$  и  $t=1,093$  соответственно). Можно предположить, что при малом различии длины олигонуклеотидов, Разница в точности сборки генной конструкции незначительна.

### 3.3.5. Влияние способа разбиения на олигонуклеотиды на ошибочность собираемых конструкций

Провели проверку влияния алгоритма разбиения на олигонуклеотиды на ошибочность генных конструкций. Последовательность гена GFP была разбита на олигонуклеотиды двумя алгоритмами: DnaWorks и GeneCut (табл. 1 и 2). Из полученных олигонуклеотидов были собраны фрагменты целевой длины методом PCA. Условия сборки: полимеразы Pfu-Sso7d (Биолабмикс, Россия), температуры отжига в ПЦР1 58 °C,

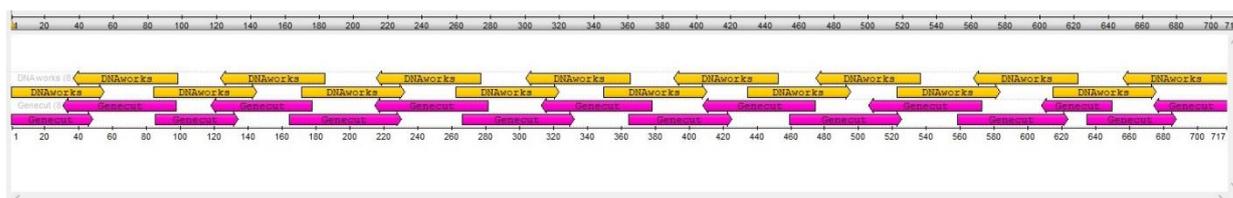
в ПЦР2 60 °С. Полученные генные конструкции были клонированы в плазмиду pUC19 по сайтам рестрикции BamHI и HindIII. Полученными плазмидными конструкциями были трансформированы клетки *E. coli* штамма NovaBlue. Для каждого набора олигонуклеотидов, из 10 клонов, содержащих вставку целевой длины, были выделены плазмиды со вставкой. Участки плазмид, содержащие вставку, были секвенированы методом Сэнгера. Было подсчитано количество ошибок каждого типа (рис 11).



**Рис. 11.** Количество ошибок различных типов в клонах, полученных из наборов олигонуклеотидов с различным разбиением.

Сравнивая полученные данные, можно заметить, что разница в суммарном количестве делеций статистически значима ( $t=2,61$ ). Есть статистически значимое отличие количества делеций A/T>- ( $t=2,14$ ). Разница в количестве делеций C/G>- статистически не значима ( $t=1,61$ ). Таким образом, способ разбиения последовательности на олигонуклеотиды влияет на структуру ошибок, в частности, количество делеций различается более чем в 2 раза. При рассмотрении последовательностей олигонуклеотидов (табл. 1 и 2) можно обнаружить, что все олигонуклеотиды DnaWorks, кроме первого, имеют одинаковую длину 60 нт. Олигонуклеотиды GeneCut имеют различную длину от 40 до 65 нт. Также при рассмотрении выравнивания наборов олигонуклеотидов на последовательность можно обнаружить, что в первой половине последовательности олигонуклеотиды из различных разбиений почти не различаются, и области их перекрытия находятся в одних и тех же местах. Однако во второй половине различие между олигонуклеотидами из различных разбиений, а также областями перекрытия олигонуклеотидов более значительны (Рис 12). За счёт различной длины олигонуклеотидов в GeneCut есть возможность подобрать олигонуклеотиды с менее

устойчивыми нецелевыми комплексами, что может влиять на снижение ошибок при сборке.



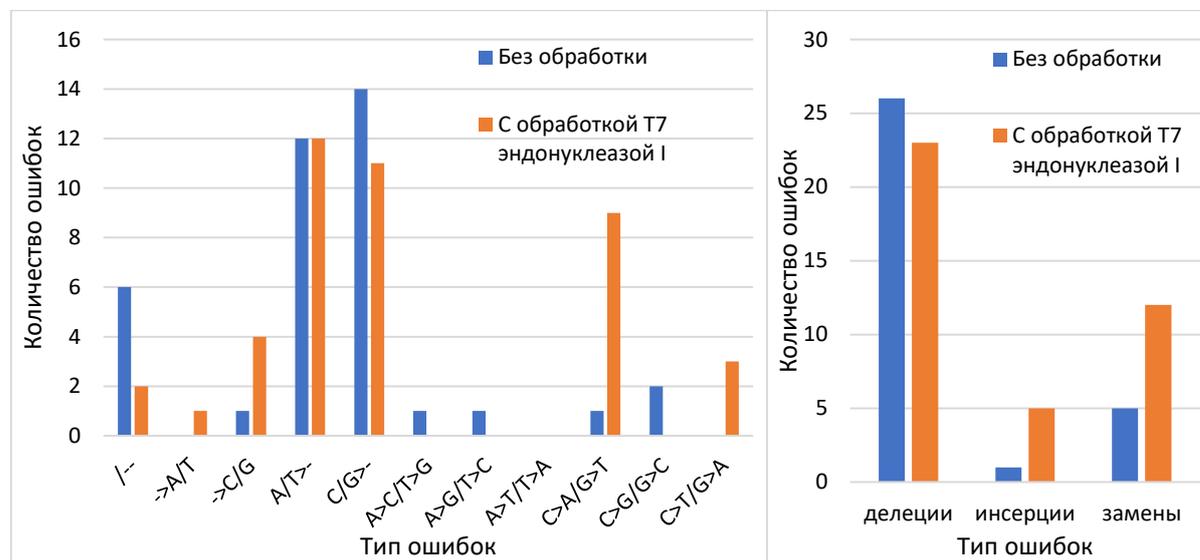
**Рис 12.** Выравнивание последовательностей олигонуклеотидов, полученных при разбиении программами DnaWorks (желтые) и GeneCut (фиолетовые) на исходную последовательность.

### 3.3.6. Влияние обработки мисматч-распознающими ферментами на ошибочность собираемых конструкций

В литературе описаны примеры использования мисматч-распознающих белков для снижения ошибочности синтетических генных конструкций. Для этого проводится плавление и отжиг генных конструкций. Изначально в пуле молекул присутствуют дуплексы из полностью комплементарных друг другу цепей ДНК, при этом последовательности этих дуплексов могут быть как корректными, так и некорректными. После проведения плавления и отжига образуются 3 типа дуплексов: 1) Дуплекс из двух корректных цепей. В этом случае цепи полностью комплементарны друг другу. 2) Дуплекс из одной корректной и одной некорректной цепи. В этом случае в дуплексе имеется хотя бы одна некомплементарная пара оснований или выпетливание. 3) Дуплекс из двух некорректных цепей. В этом случае, как и в предыдущем, в дуплексе имеется хотя бы одна некомплементарная пара оснований или выпетливание, поскольку появление ошибок случайно, и вероятность появления комплементарных ошибок и встречи цепей ДНК с комплементарными ошибками крайне мала. Таким образом, мисматч-распознающие белки будут взаимодействовать с дуплексами, содержащими хотя бы одну некорректную цепь, а с дуплексами, не содержащими ошибок, взаимодействовать не будут. Ранее было показано (рис. 3), основную долю ошибок (73%) составляют делеции. Из литературных данных известно, что Корректаза (Lubock et al., 2017) и T7 эндонуклеаза (Sequeira et al., 2016) могут снижать количество делеций. Таким образом для снижения ошибочности генных конструкций использовали именно эти ферменты.

Провели проверку влияния обработки T7 эндонуклеазой на ошибочность генных конструкций. Генная конструкция GFP была собрана методом ПСА. Условия сборки ПСА полимеразы Pfu-Sso7d (Биолабмикс, Россия), температуры отжига в ПЦР1 58 °С, в ПЦР2 60 °С. Далее, после плавления и отжига, была проведена обработка T7 эндонуклеазой. После обработки генная конструкция была клонирована в плазмиду pUC19, по сайтам

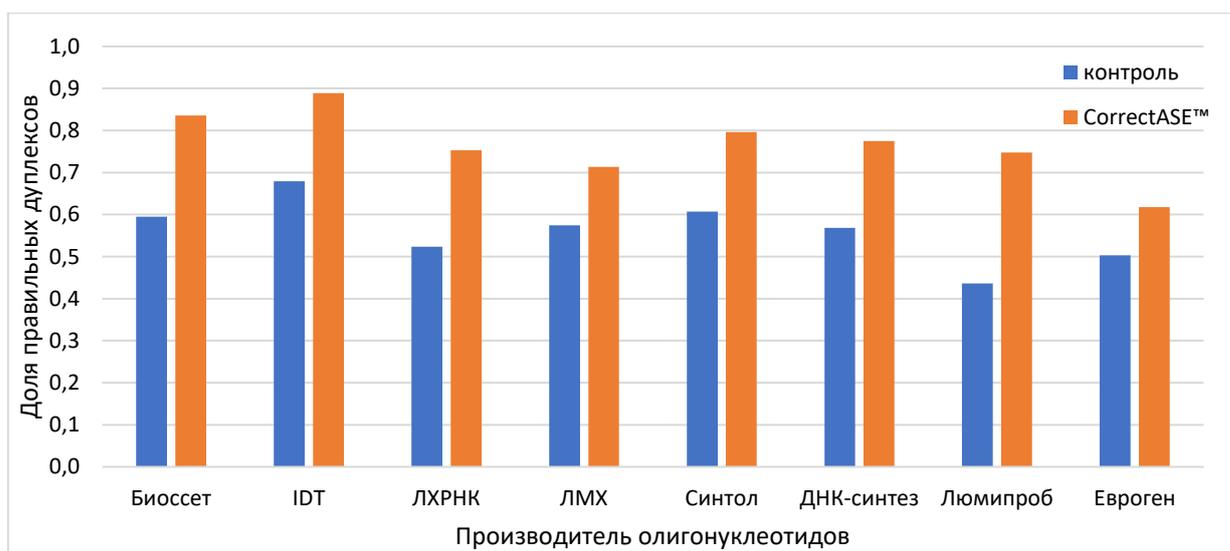
рестрикции BamHI и HindIII. Полученной плазмидной конструкцией были трансформированы клетки *E. coli* штамма NovaBlue. Из 10 клонов, содержащих вставку целевой длины, были выделены плазмиды со вставкой. Участки плазмид, содержащие вставку, были секвенированы методом Сэнгера. Провели сравнение структуры ошибок в генных конструкциях без обработки и с обработкой T7 эндонуклеазой (рис. 13).



**Рис 13.** Количество ошибок различных типов в клонах, до и после обработки T7 эндонуклеазой I.

Сравнивая полученные результаты, можно заметить, что различие в суммарном количестве ошибок статистически не значимы ( $t=0,429$ ). Разница в количестве делеций A/T>- и C/G>- также статистически не значима ( $t=0,00$  и  $t=0,60$  соответственно). Таким образом, обработка T7 эндонуклеазой не привела к снижению числа делеций и, возможно, привела к увеличению количества инсерций и замен. Возможно, столь незначительное снижение числа делеций и рост числа инсерций и замен связано с отсутствием очистки неразрезанных T7 эндонуклеазой ДНК от разрезанных. При ПЦР после обработки T7 эндонуклеазой фрагменты ДНК могут собираться обратно в полноразмерный фрагмент с ошибкой.

Также провели проверку обработки «Корректазой» на ошибочность генных конструкций. В качестве модельных объектов использовали дуплексы олигонуклеотидов от 12 различных производителей. Для каждого из образцов были проведены плавление и отжиг. Далее образцы были обработаны «Корректазой» и очищены в ПААГ. Полученные дуплексы были секвенированы методом NGS. Была подсчитана доля корректных прочтений в секвенированных дуплексах и проведено сравнение с долей корректных прочтений без обработки «Корректазой» (рис. 14).



**Рис. 14.** Доля правильных дуплексов до и после обработки «Корректазой». Олигонуклеотиды от 12-и разных производителей

Сравнивая полученные результаты, можно заметить, что обработка «Корректазой» позволяет увеличить долю корректных дуплексов до 1,7 раза. Тем не менее, чем больше доля корректных последовательностей исходно, тем слабее она увеличится после обработки «Корректазой».

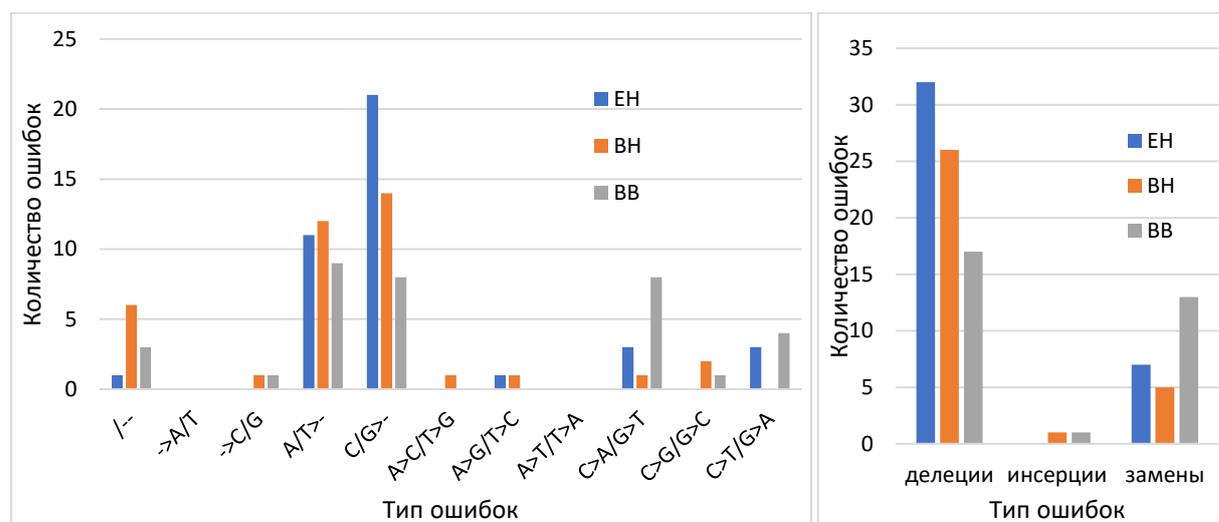
### 3.3.7. Влияние сайтов распознавания систем репарации клетки на ошибочность собираемых конструкций

Известны примеры использования белка MutS для снижения ошибочности собираемых генных конструкций (Sidore et al., 2020)(Carr et al., 2004)(Smith & Modrich, 1997). Согласно литературным данным, обработка MutS позволяет до 25 раз увеличить долю корректных последовательностей от 1,9 до 47,8%. При этом в 15,2 раза снижается количество замен C>G/G>C и в 4,4 раза — замен A>G/T>C (Lubbock et al., 2017). MutS – белок системы репарации. Он связывается с участком ДНК, содержащим мисматчи, и является отправной точкой для репарации повреждённого участка ДНК. При применении MutS для снижения ошибочности MutS используется для удаления из пула дуплексов, содержащих мисматчи.

Нами был предложен метод снижения ошибочности в синтетических генных конструкциях с использованием системы репарации *E. coli*. Сайт рестриктазы BamHI GGATCC содержит сайт метилирования GATC. У плазмиды, из которой готовится линеаризованный вектор, обе цепи метилированы. При клонировании вставки по сайту BamHI, за счет липких концов образуется сайт метилирования, в котором липкий конец от вектора метилирован, а липкий конец от вставки – не метилирован. Таким образом, после трансформации клеток, при наличии во вставке мисматчей, будет происходить

репарация мисматчей. Репарироваться будет цепь, в которой липкий конец в сайте BamHI был от вставки, а значит, неметилованный.

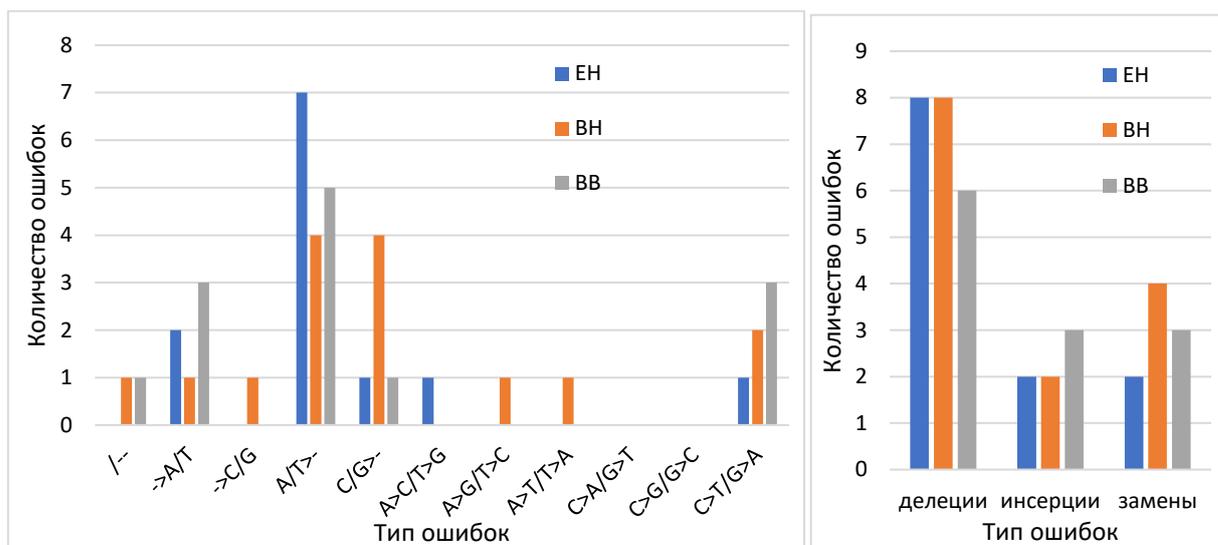
Проверку возможности снижения ошибочности синтетических генных конструкций с помощью систем репарации *in vivo* проводили на примере двух модельных последовательностей: гена GFP и гена T5 экзонуклеазы. Генные конструкции были синтезированы методом ПСА. Условия сборки для гена GFP полимеразы Pfu-Sso7d (Биолабмикс, Россия), температуры отжига в ПЦР1 58 °С, в ПЦР2 60 °С. Условия сборки для гена T5 экзонуклеазы полимеразы Pfu-Sso7d (Биолабмикс, Россия), температуры отжига в ПЦР1 60 °С, в ПЦР2 61 °С. Далее были проведены плавление и отжиг. Генные конструкции были клонированы в плазмиду pUC19 тремя способами: по сайтам BamHI/BamHI, BamHI/HindIII, EcoRI/HindIII. Полученными плазмидными конструкциями были трансформированы клетки *E. coli* штамма NovaBlue. Для каждой генной конструкции и для каждого типа клонирования из 10 клонов, содержащих вставку целевой длины, были выделены плазмиды со вставкой. Участки плазмид, содержащие вставку, были секвенированы методом Сэнгера. Было подсчитано количество ошибок каждого типа (рис. 15, 16).



**Рис. 15.** Количество ошибок различных типов в клонах GFP, клонированных по различным сайтам рестрикции.

По результатам секвенирования GFP заметно статистически значимое снижение суммарного числа делеций при клонировании BamHI/BamHI по сравнению с EcoRI/HindIII ( $t=2,14$ ). Суммарное число делеций при клонировании по BamHI/HindIII находится между ними. Также, статистически значимо различаются количества делеций C/G>- при клонировании BamHI/BamHI по сравнению с EcoRI/HindIII ( $t=2,42$ ). число делеций при клонировании по BamHI/HindIII находится между ними. Рост суммарного

числа замен при клонировании по *Vam*HI/*Vam*HI по сравнению с *Eco*RI/*Hind*III статистически незначим ( $t=1,34$ ).



**Рис. 16.** Количество ошибок различных типов в клонах T5, клонированных по различным сайтам рестрикции.

По результатам секвенирования гена T5 экзонуклеазы можно обнаружить, что снижение суммарного числа делеций при клонировании по *Vam*HI/*Vam*HI по сравнению с *Eco*RI/*Hind*III статистически незначимо ( $t=0,535$ ). Снижение числа делеций A/T>- при клонировании по *Vam*HI/*Vam*HI по сравнению с *Vam*HI /*Hind*III также статистически незначимо ( $t=0,905$ ). Поскольку исходное количество делеций в случае GFP в 3 раза больше, чем в случае T5 экзонуклеазы, то можно предположить, что снижение числа делеций за счёт системы репарации возможно только при большом количестве ошибок.

## Выводы

1. Был отработан подход к разбиению последовательностей генов на набор олигонуклеотидов для последующей ферментативной сборки методом PCA и LCA. Были отработаны условия ферментативной сборки последовательности генов методом PCA и LCA.
2. Было исследовано влияние различных факторов на количество ошибок в синтетических генных конструкциях, а именно: способа очистки олигонуклеотидов, производителя олигонуклеотидов, способа сборки генной конструкции (PCA или LCA), длины исходных олигонуклеотидов, способа разбиения на олигонуклеотиды, обработки собранной генной конструкции различными мисматч-распознающими ферментами.
3. Было показано, что способ предварительной очистки олигонуклеотидов и способ сборки (PCA или LCA) не влияют на ошибочность генных конструкций. Также была показана неэффективность выбранного способа обработки T7 эндонуклеазой I для снижения ошибочности генных конструкций.
4. Было показано, что длина олигонуклеотидов и способ разбиения последовательности на олигонуклеотиды, а также обработка Корректазой влияют на ошибочность генной конструкции. Также, было показано зависимость ошибочности синтетической генной конструкции от производителя исходных олигонуклеотидов.
5. Был предложен и исследован метод снижения ошибочности генных конструкций с использованием систем репарации *E. coli*. Впервые была показана эффективность метода снижения ошибочности генных конструкций с использованием систем репарации *E. Coli* на последовательностях с изначально большим числом ошибок.

## Список литературы

1. Agarwal, K. L., Büchi, H., Caruthers, M. H., Gupta, N., Khorana, H. G., Kleppe, K., Kumar, A., Ohtsuka, E., Rajbhandary, U. L., Van De Sande, J.H. Sgaramella, V., Weber, H., & Yamada, T. (1970). Total Synthesis of Gene for an Alanine Transfer Ribonucleic Acid from Yeast. *Nature*, 227, 27–34. <http://www.mendeley.com/research/discreteness-conductance-change-n-bimolecular-lipid-membrane-presence-certain-antibiotics/>
2. Brzezinska, J., Trzeciński, S., Strzelec, J., & Chmielewski, M. K. (2023). *From CPG to hybrid support: Review on the approaches in nucleic acids synthesis in various media*. 140(June). <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2023.106806>
3. Carr, P. A., Park, J. S., Lee, Y. J., Yu, T., Zhang, S., & Jacobson, J. M. (2004). Protein-mediated error correction for de novo DNA synthesis. *Nucleic Acids Research*, 32(20), 1–9. <https://doi.org/10.1093/nar/gnh160>
4. Dolgova, A. S., & Stukolova, O. A. (2017). High-fidelity PCR enzyme with DNA-binding domain facilitates de novo gene synthesis. *3 Biotech*, 7(2). <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0745-2>
5. Eckert, K. A., & Kunkel, T. A. (1991). DNA polymerase fidelity and the polymerase chain reaction. *Genome Research*, 1(1), 17–24. <https://doi.org/10.1101/gr.1.1.17>
6. Gao, X., Yo, P., Keith, A., Ragan, T. J., & Harris, T. K. (2003). Thermodynamically balanced inside-out (TBIO) PCR-based gene synthesis: a novel method of primer design for high-fidelity assembly of longer gene sequences. *Nucleic Acids Research*, 31(22), 1–11. <https://doi.org/10.1093/nar/gng143>
7. Gibson, D. G., Glass, J. I., Lartigue, C., Noskov, V. N., Chuang, R. Y., Algire, M. A., Benders, G. A., Montague, M. G., Ma, L., Moodie, M. M., Merryman, C., Vashee, S., Krishnakumar, R., Assad-Garcia, N., Andrews-Pfannkoch, C., Denisova, E. A., Young, L., Qi, Z. N., Segall-Shapiro, T. H., ... Venter, J. C. (2010). Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science*, 329(5987), 52–56. <https://doi.org/10.1126/science.1190719>
8. Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R.-Y., Venter, J. C., Hutchison, C. A., & Smith, H. O. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods*, 6(5), 343–345. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1318>
9. Hughes, R. A. (2017). Synthetic DNA Methods and Protocols. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1472). [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6343-0\\_17](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6343-0_17)
10. Lubock, N. B., Zhang, D., Sidore, A. M., Church, G. M., & Kosuri, S. (2017). A systematic comparison of error correction enzymes by next-generation sequencing. *Nucleic Acids Research*, 45(15), 9206–9217. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx691>

11. Maniatis, T., Fritsch, E. F., & Sambrook, J. (1984). *Молекулярное клонирование, Методы генетической инженерии*. “Мир.”
12. Okonechnikov, K., Golosova, O., Fursov, M., Varlamov, A., Vaskin, Y., Efremov, I., German Grehov, O. G., Kandrova, D., Rasputin, K., Syabro, M., & Tleukenov, T. (2012). Unipro UGENE: A unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*, 28(8), 1166–1167. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091>
13. Ryan, J., Brown, E. L., Sekiya, T., Kiipper, H., & Khorana, H. G. (1979). Total Synthesis of a Tyrosine Suppressor tRNA Gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 264(13), 5817–5826.
14. Saaem, I., Ma, S., Quan, J., & Tian, J. (2012). Error correction of microchip synthesized genes using Surveyor nuclease. *Nucleic Acids Research*, 40(3), 1–8. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr887>
15. Scarlett, G. (2023). *DNA Manipulation and Analysis*. <http://www.springer.com/series/7651>
16. Sequeira, A. F., Guerreiro, C. I. P. D., Vincentelli, R., & Fontes, C. M. G. A. (2016). T7 Endonuclease I Mediates Error Correction in Artificial Gene Synthesis. *Molecular Biotechnology*, 58(8–9), 573–584. <https://doi.org/10.1007/s12033-016-9957-7>
17. Shendure, J., Balasubramanian, S., Church, G. M., Gilbert, W., Rogers, J., Schloss, J. A., & Waterston, R. H. (2017). DNA sequencing at 40: Past, present and future. *Nature*, 550(7676). <https://doi.org/10.1038/nature24286>
18. Sidore, A. M., Plesa, C., Samson, J. A., Lubock, N. B., & Kosuri, S. (2020). DropSynth 2.0: High-fidelity multiplexed gene synthesis in emulsions. *Nucleic Acids Research*, 48(16), E95. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa600>
19. Smith, J., & Modrich, P. (1997). Removal of polymerase-produced mutant sequences from PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(13), 6847–6850. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.13.6847>
20. TerMaat, J. R., Pienaar, E., Whitney, S. E., Mamedov, T. G., & Subramanian, A. (2009). Gene synthesis by integrated polymerase chain assembly and PCR amplification using a high-speed thermocycler. *Journal of Microbiological Methods*, 79(3), 295–300. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.09.015>

# Отчет о проверке на заимствования №1



**Автор:** Переверзев И. М.

**Проверяющий:** Гапонова Светлана Константиновна

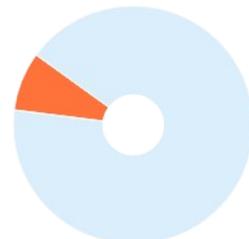
Отчет предоставлен сервисом «Антиплагиат» - <http://users.antiplagiat.ru>

## ИНФОРМАЦИЯ О ДОКУМЕНТЕ

№ документа: 16  
 Начало загрузки: 11.09.2023 13:10:37  
 Длительность загрузки: 00:00:57  
 Имя исходного файла:  
 научный\_доклад\_Переверзев\_без  
 ссылок.docx  
 Название документа:  
 научный\_доклад\_Переверзев\_без ссылок  
 Размер текста: 63 кБ  
 Символов в тексте: 64082  
 Слов в тексте: 7430  
 Число предложений: 512  
 Способ извлечения текста: OCR

## ИНФОРМАЦИЯ ОБ ОТЧЕТЕ

Начало проверки: 11.09.2023 13:11:35  
 Длительность проверки: 00:00:48  
 Комментарии: не указано  
 Поиск с учетом редактирования: да  
 Модули поиска: ИПС Адилет, Библиография, Сводная коллекция ЭБС, Интернет Плюс\*, Сводная коллекция РГБ, Цитирование, Переводные заимствования (RuEn), Переводные заимствования по eLIBRARY.RU (EnRu), Переводные заимствования по eLIBRARY.RU (KkRu), Переводные заимствования по eLIBRARY.RU (KyRu), Переводные заимствования по коллекции Гарант: аналитика, Переводные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте, Переводные заимствования по Интернету (EnRu), Переводные заимствования по Интернету (KkRu), Переводные заимствования по Интернету (KyRu), Переводные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте, Переводные заимствования (KkEn), Переводные заимствования (KyEn), Переводные заимствования издательства Wiley, eLIBRARY.RU, СПС ГАРАНТ: аналитика, СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация, IEEE, Медицина, Диссертации НББ, Коллекция НБУ, Перефразирования по eLIBRARY.RU, Перефразирования по СПС ГАРАНТ: аналитика, Перефразирования по Интернету, Перефразирования по Интернету (EN), Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте, Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте, Перефразирования по коллекции издательства Wiley, Патенты СССР, РФ, СНГ, СМИ России и СНГ, Шаблонные фразы, Кольцо вузов, Издательство Wiley, Переводные заимствования



### СОВПАДЕНИЯ

8,34% 

### САМОЦИТИРОВАНИЯ

0% 

### ЦИТИРОВАНИЯ

0% 

### ОРИГИНАЛЬНОСТЬ

91,66% 

**Совпадения** — фрагменты проверяемого текста, полностью или частично сходные с найденными источниками, за исключением фрагментов, которые система отнесла к цитированию или самоцитированию. Показатель «Совпадения» — это доля фрагментов проверяемого текста, отнесенных к совпадениям, в общем объеме текста.

**Самоцитирование** — фрагменты проверяемого текста, совпадающие или почти совпадающие с фрагментом текста источника, автором или соавтором которого является автор проверяемого документа. Показатель «Самоцитирования» — это доля фрагментов текста, отнесенных к самоцитированию, в общем объеме текста.

**Цитирования** — фрагменты проверяемого текста, которые не являются авторскими, но которые система отнесла к корректно оформленным. К цитированиям относятся также шаблонные фразы; библиография; фрагменты текста, найденные модулем поиска «СПС Гарант: нормативно-правовая документация». Показатель «Цитирования» — это доля фрагментов проверяемого текста, отнесенных к цитированию, в общем объеме текста.

**Текстовое пересечение** — фрагмент текста проверяемого документа, совпадающий или почти совпадающий с фрагментом текста источника.

**Источник** — документ, проиндексированный в системе и содержащийся в модуле поиска, по которому проводится проверка.

**Оригинальный текст** — фрагменты проверяемого текста, не обнаруженные ни в одном источнике и не отмеченные ни одним из модулей поиска. Показатель «Оригинальность» — это доля фрагментов проверяемого текста, отнесенных к оригинальному тексту, в общем объеме текста.

«Совпадения», «Цитирования», «Самоцитирование», «Оригинальность» являются отдельными показателями, отображаются в процентах и в сумме дают 100%, что соответствует полному тексту проверяемого документа.

Обращаем Ваше внимание, что система находит текстовые совпадения проверяемого документа с проиндексированными в системе источниками. При этом система является вспомогательным инструментом, определение корректности и правомерности совпадений или цитирований, а также авторства текстовых фрагментов проверяемого документа остается в компетенции проверяющего.

№	Доля в тексте	Доля в отчете	Источник	Актуален на	Модуль поиска	Блоков в отчете	Блоков в тексте	Комментарии
[01]	2%	0,87%	openbio_tezis_2020.pdf <a href="https://openbio.ru">https://openbio.ru</a>	20 Авг 2022	Интернет Плюс*	10	22	
[02]	1,76%	1,15%	https://openbio.ru/openbio_tezis_2021.... <a href="https://openbio.ru">https://openbio.ru</a>	07 Апр 2022	Интернет Плюс*	7	12	
[03]	1,55%	0,64%	BMF-2019_final_compressed.pdf <a href="https://cnmt.ru">https://cnmt.ru</a>	25 Мая 2021	Интернет Плюс*	8	16	
[04]	1,44%	0,05%	https://www.openbio.ru/openbio_tezis... <a href="https://openbio.ru">https://openbio.ru</a>	26 Ноя 2019	Интернет Плюс*	1	16	
[05]	1,37%	0,07%	Природные каталитические иммуног... <a href="https://vak.minobrnauki.gov.ru">https://vak.minobrnauki.gov.ru</a>	02 Апр 2021	Интернет Плюс*	1	9	
[06]	1,25%	0,23%	ASSA <a href="http://assa.bionet.nsc.ru">http://assa.bionet.nsc.ru</a>	27 Июл 2020	Интернет Плюс*	3	14	
[07]	1,24%	0,47%	Ермаков, Евгений Александрович Пр... <a href="http://dlib.rsl.ru">http://dlib.rsl.ru</a>	16 Июн 2021	Сводная коллекция РГБ	3	7	
[08]	1,04%	0,46%	oscorbin_dissert.pdf <a href="http://niboch.nsc.ru">http://niboch.nsc.ru</a>	05 Июн 2021	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	1	3	

[09]	1,01%	1,01%	openbio_tezis_2020.pdf <a href="https://openbio.ru">https://openbio.ru</a>	20 Авг 2022	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	3	3	
[10]	1,01%	0%	<a href="https://www.openbio.ru/openbio_tezis...">https://www.openbio.ru/openbio_tezis...</a> <a href="https://openbio.ru">https://openbio.ru</a>	26 Мая 2023	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	0	3	
[11]	0,96%	0%	не указано	13 Янв 2022	Шаблонные фразы	0	20	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[12]	0,95%	0%	ASSA <a href="http://assa.bionet.nsc.ru">http://assa.bionet.nsc.ru</a>	11 Сен 2023	Интернет Плюс*	0	7	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[13]	0,93%	0%	<a href="http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/fetch...">http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/fetch...</a> <a href="http://niboch.nsc.ru">http://niboch.nsc.ru</a>	01 Сен 2022	Интернет Плюс*	0	5	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[14]	0,92%	0%	ОЦЕНКА ИЗМЕНЕНИЯ УРОВНЯ ХРОМ... <a href="http://elibrary.ru">http://elibrary.ru</a>	01 Янв 2022	eLIBRARY.RU	0	5	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[15]	0,91%	0%	Павлова, Гера Алексеевна Роль белко... <a href="http://dlib.rsl.ru">http://dlib.rsl.ru</a>	01 Янв 2020	Сводная коллекция РГБ	0	5	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[16]	0,9%	0%	<a href="http://ibmc.msk.ru/content/thesisDocs...">http://ibmc.msk.ru/content/thesisDocs...</a> <a href="http://ibmc.msk.ru">http://ibmc.msk.ru</a>	08 Июн 2021	Интернет Плюс*	0	6	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[17]	0,84%	0%	ASSA <a href="http://assa.bionet.nsc.ru">http://assa.bionet.nsc.ru</a>	22 Авг 2023	Интернет Плюс*	0	9	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[18]	0,83%	0%	ASSA <a href="http://assa.bionet.nsc.ru">http://assa.bionet.nsc.ru</a>	16 Мар 2020	Интернет Плюс*	0	7	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[19]	0,81%	0,57%	rs101010363390.txt <a href="http://dlib.rsl.ru">http://dlib.rsl.ru</a>	29 Мар 2022	Сводная коллекция РГБ	1	2	
[20]	0,8%	0,59%	Dissertacia_osterman_s.pdf <a href="https://istina.msu.ru">https://istina.msu.ru</a>	12 Мая 2021	Переводные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	2	2	
[21]	0,79%	0%	Меднова, Ирина Андреевна Клинико-... <a href="http://dlib.rsl.ru">http://dlib.rsl.ru</a>	01 Янв 2020	Сводная коллекция РГБ	0	4	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[22]	0,76%	0%	Филиппова, Екатерина Игоревна Про... <a href="http://dlib.rsl.ru">http://dlib.rsl.ru</a>	28 Июн 2022	Сводная коллекция РГБ	0	5	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[23]	0,76%	0%	<a href="http://www.vector.nsc.ru/userfiles/files/...">http://www.vector.nsc.ru/userfiles/files/...</a> <a href="http://vector.nsc.ru">http://vector.nsc.ru</a>	11 Сен 2023	Интернет Плюс*	0	5	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[24]	0,73%	0,39%	.doc (zip, 124 кБ) <a href="http://ej.kubagro.ru">http://ej.kubagro.ru</a>	08 Авг 2014	Переводные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	1	2	
[25]	0,69%	0%	<a href="https://www.tnimc.ru/upload/publicati...">https://www.tnimc.ru/upload/publicati...</a> <a href="https://tnimc.ru">https://tnimc.ru</a>	08 Сен 2022	Интернет Плюс*	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[26]	0,68%	0%	Постановление Правительства Новос... <a href="http://ivo.garant.ru">http://ivo.garant.ru</a>	29 Дек 2019	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[27]	0,68%	0%	Доказана возможность передачи кор... <a href="https://poisknews.ru">https://poisknews.ru</a>	27 Окт 2022	СМИ России и СНГ	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[28]	0,62%	0%	Галимова, Юлия Александровна Роль... <a href="http://dlib.rsl.ru">http://dlib.rsl.ru</a>	01 Янв 2022	Сводная коллекция РГБ	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[29]	0,61%	0,61%	BMF-2019_final_compressed.pdf <a href="https://cnmt.ru">https://cnmt.ru</a>	25 Мая 2021	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	1	1	
[30]	0,61%	0%	<a href="https://www.mcb.nsc.ru/sites/mcb.nsc.r...">https://www.mcb.nsc.ru/sites/mcb.nsc.r...</a> <a href="https://mcb.nsc.ru">https://mcb.nsc.ru</a>	11 Сен 2023	Интернет Плюс*	0	4	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[31]	0,6%	0%	<a href="http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/fetch...">http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/fetch...</a> <a href="http://niboch.nsc.ru">http://niboch.nsc.ru</a>	27 Апр 2022	Интернет Плюс*	0	5	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[32]	0,57%	0%	ИССЛЕДОВАНИЕ ТОЧНОСТИ СИНТЕЗ... <a href="https://elibrary.ru">https://elibrary.ru</a>	31 Дек 2021	eLIBRARY.RU	0	4	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[33]	0,53%	0%	Моллаев, Мурад Довлетович Разрабо... <a href="http://dlib.rsl.ru">http://dlib.rsl.ru</a>	01 Янв 2022	Сводная коллекция РГБ	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[34]	0,52%	0%	Т. 2 <a href="http://emll.ru">http://emll.ru</a>	08 Июл 2017	Медицина	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[35]	0,49%	0%	Джаксыбаев Арыстан.16-111	08 Июн 2023	Кольцо вузов	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

[36]	0,49%	0%	не указано <a href="http://ivo.garant.ru">http://ivo.garant.ru</a>	04 Авг 2022	СПС ГАРАНТ: аналитика	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[37]	0,49%	0%	54744 <a href="http://e.lanbook.com">http://e.lanbook.com</a>	09 Мар 2016	Сводная коллекция ЭБС	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[38]	0,49%	0%	Средство для нейтрализации вируса н... <a href="http://findpatent.ru">http://findpatent.ru</a>	25 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[39]	0,49%	0%	Рекомбинантная плазмидная днк рм... <a href="http://findpatent.ru">http://findpatent.ru</a>	24 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[40]	0,49%	0%	Способ получения наноразмерной с... <a href="http://findpatent.ru">http://findpatent.ru</a>	25 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[41]	0,49%	0%	Модели, методика и средства разраб... <a href="http://dep.nlb.by">http://dep.nlb.by</a>	06 Дек 2018	Диссертации НББ	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[42]	0,49%	0%	Interpretation of radioimpedance soun... <a href="https://ieeexplore.ieee.org">https://ieeexplore.ieee.org</a>	04 Ноя 2013	IEEE	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[43]	0,49%	0%	Поздравляем директора Российско-а... <a href="http://barnaul.bezformata.com">http://barnaul.bezformata.com</a>	17 Авг 2019	СМИ России и СНГ	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[44]	0,49%	0%	Теоретические основы новых направ... <a href="http://emll.ru">http://emll.ru</a>	21 Дек 2016	Медицина	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[45]	0,49%	0%	ASSA <a href="http://assa.bionet.nsc.ru">http://assa.bionet.nsc.ru</a>	29 Апр 2020	Интернет Плюс*	0	4	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[46]	0,46%	0,46%	<a href="https://ir.ucc.edu.gh/xmlui/bitstream/h...">https://ir.ucc.edu.gh/xmlui/bitstream/h...</a> <a href="https://ir.ucc.edu.gh">https://ir.ucc.edu.gh</a>	01 Янв 2023	Переводные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте	1	1	
[47]	0,39%	0,39%	Improving Lactation Curve Prediction b... <a href="https://ieeexplore.ieee.org">https://ieeexplore.ieee.org</a>	08 Июн 2023	IEEE	1	1	
[48]	0,39%	0%	A framework to correlate power consu... <a href="https://ieeexplore.ieee.org">https://ieeexplore.ieee.org</a>	14 Авг 2017	IEEE	0	1	
[49]	0,39%	0%	Novel Adaptive Data Collection based o... <a href="https://ieeexplore.ieee.org">https://ieeexplore.ieee.org</a>	26 Мар 2020	IEEE	0	1	
[50]	0,39%	0%	Fragmentations of (M-H)- anions of un... <a href="https://doi.org">https://doi.org</a>	06 Ноя 2008	Издательство Wiley	0	1	
[51]	0,37%	0%	Off-line capillary electrophoresis/fully a... <a href="https://doi.org">https://doi.org</a>	04 Окт 2004	Издательство Wiley	0	1	
[52]	0,37%	0,37%	openbio_tezis_2020.pdf <a href="https://openbio.ru">https://openbio.ru</a>	20 Авг 2022	Переводные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	1	1	
[53]	0,37%	0%	<a href="https://www.openbio.ru/openbio_tezis...">https://www.openbio.ru/openbio_tezis...</a> <a href="https://openbio.ru">https://openbio.ru</a>	26 Мая 2023	Переводные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	0	1	
[54]	0,34%	0%	Создание селекционных форм риса, н... <a href="https://spravochnik.ru">https://spravochnik.ru</a>	10 Янв 2023	Переводные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[55]	0,33%	0%	141945 <a href="http://biblioclub.ru">http://biblioclub.ru</a>	18 Апр 2016	Сводная коллекция ЭБС	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[56]	0,33%	0%	Генетические основы формирования... <a href="https://earthpapers.net">https://earthpapers.net</a>	11 Сен 2023	Интернет Плюс*	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[57]	0,3%	0%	Multi-area Path Planning for Wireless Se... <a href="https://ieeexplore.ieee.org">https://ieeexplore.ieee.org</a>	28 Дек 2020	IEEE	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[58]	0,27%	0%	Теоретические и экспериментальные... <a href="https://elibrary.ru">https://elibrary.ru</a>	20 Дек 2022	eLIBRARY.RU	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[59]	0,27%	0%	Совершенствование водораспреде... <a href="http://diss.natlib.uz">http://diss.natlib.uz</a>	02 Сен 2014	Коллекция НБУ	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[60]	0,27%	0%	Клинико-экспериментальное обосно... <a href="http://diss.natlib.uz">http://diss.natlib.uz</a>	02 Сен 2014	Коллекция НБУ	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[61]	0,26%	0%	Isolation, structure elucidation and biol... <a href="https://doi.org">https://doi.org</a>	05 Ноя 2003	Издательство Wiley	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[62]	0,26%	0%	30370992.pdf <a href="https://core.ac.uk">https://core.ac.uk</a>	11 Сен 2023	Интернет Плюс*	0	6	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[63]	0,25%	0%	List of abstracts accepted for publication <a href="https://bgrssb.icgbio.ru">https://bgrssb.icgbio.ru</a>	11 Сен 2023	Интернет Плюс*	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[64]	0,24%	0%	Differentiation of three pairs of aconite ... <a href="https://doi.org">https://doi.org</a>	06 Дек 2005	Издательство Wiley	0	4	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

[65]	0,22%	0%	<a href="https://www.icgbio.ru/wp-content/uplo...">https://www.icgbio.ru/wp-content/uplo...</a> <a href="https://icgbio.ru">https://icgbio.ru</a>	11 Сен 2023	Интернет Плюс*	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[66]	0,2%	0%	1679798 - Рекомбинантная плазмидна... <a href="https://patentdb.ru">https://patentdb.ru</a>	26 Авг 2021	Интернет Плюс*	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[67]	0,18%	0%	Вестник гематологии. Том IX. № 2, 2013 <a href="http://bibliorossica.com">http://bibliorossica.com</a>	26 Мая 2016	Сводная коллекция ЭБС	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[68]	0,18%	0%	Молекулярная биология. 2017. Т. 51, ... <a href="http://biblioclub.ru">http://biblioclub.ru</a>	21 Янв 2020	Сводная коллекция ЭБС	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[69]	0,18%	0%	Молекулярная биология. 2017. Т. 51, ... <a href="http://biblioclub.ru">http://biblioclub.ru</a>	21 Янв 2020	Сводная коллекция ЭБС	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[70]	0,18%	0%	Всероссийская научно-практическая ... <a href="http://emll.ru">http://emll.ru</a>	21 Дек 2016	Медицина	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[71]	0,18%	0%	Артериальная гипертония у лиц приз... <a href="http://emll.ru">http://emll.ru</a>	21 Дек 2016	Медицина	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[72]	0,18%	0%	Т. XCIV, № 4, июль-август <a href="http://emll.ru">http://emll.ru</a>	21 Дек 2016	Медицина	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[73]	0,18%	0%	Ефимова, Наталья Николаевна Геора... <a href="http://dlib.rsl.ru">http://dlib.rsl.ru</a>	раньше 2011	Сводная коллекция РГБ	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[74]	0,17%	0%	Химико-токсикологическое исследов... <a href="http://diss.natlib.uz">http://diss.natlib.uz</a>	02 Сен 2014	Коллекция НБУ	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[75]	0,15%	0%	<a href="https://disser.spbu.ru/files/disser2/1309...">https://disser.spbu.ru/files/disser2/1309...</a> <a href="https://disser.spbu.ru">https://disser.spbu.ru</a>	21 Ноя 2019	Интернет Плюс*	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[76]	0,13%	0%	Инструкция по бонитировке крупног... <a href="http://ivo.garant.ru">http://ivo.garant.ru</a>	22 Янв 2015	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[77]	0,12%	0%	Триазиниламидофосфатные олигону... <a href="https://elibrary.ru">https://elibrary.ru</a>	31 Дек 2021	eLIBRARY.RU	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[78]	0,12%	0%	Observations of near-UV superradiance ... <a href="http://elibrary.ru">http://elibrary.ru</a>	раньше 2011	eLIBRARY.RU	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[79]	0,12%	0%	Фёдоров, Евгений Александрович Ле... <a href="http://dlib.rsl.ru">http://dlib.rsl.ru</a>	21 Сен 2021	Сводная коллекция РГБ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[80]	0,12%	0%	Решение Экономического совета Сод... <a href="http://ivo.garant.ru">http://ivo.garant.ru</a>	18 Июн 2013	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[81]	0,12%	0%	Observations of near-UV superradiance ... <a href="http://elibrary.ru">http://elibrary.ru</a>	11 Сен 2023	Интернет Плюс*	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[82]	0,12%	0%	A Review on VARIBRACE &#x2013; A We... <a href="https://ieeexplore.ieee.org">https://ieeexplore.ieee.org</a>	03 Мая 2023	IEEE	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[83]	0,12%	0%	<a href="https://mipt.ru/upload/medialibrary/85...">https://mipt.ru/upload/medialibrary/85...</a> <a href="https://mipt.ru">https://mipt.ru</a>	24 Апр 2022	Интернет Плюс*	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[84]	0,11%	0%	Постановление Администрации Циви... <a href="http://ivo.garant.ru">http://ivo.garant.ru</a>	19 Мая 2012	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[85]	0,1%	0%	<a href="https://www.tnimc.ru/upload/dissovet/...">https://www.tnimc.ru/upload/dissovet/...</a> <a href="https://tnimc.ru">https://tnimc.ru</a>	19 Июн 2022	Интернет Плюс*	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[86]	0,1%	0%	<a href="http://www.niic.nsc.ru/phocadownload...">http://www.niic.nsc.ru/phocadownload...</a> <a href="http://niic.nsc.ru">http://niic.nsc.ru</a>	05 Июн 2022	Интернет Плюс*	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
НАУКИ ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И  
ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

Отчёт о проверке текста научно-квалификационной работы на  
объём заимствования

Переверзев Иван Максимович

«Создание и реализация подходов к химико-ферментативной сборке  
протяженных двуцепочечных последовательностей ДНК»

Оригинальность работы составляет 91.66%, что соответствует требованиям  
порядка и условиям допуска научно-квалификационных работ к защите на  
заседании Итоговой аттестации в аспирантуре ИХБФМ СО РАН.

Проверку выполнила секретарь АК – к.б.н. С.К. Гапонова