

**VILNIAUS UNIVERSITETAS  
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS**

KAROLIS KUMPAITIS

**SARS-CoV-2 variantų identifikavimas naudojant 2', 3'-Dideoksinukleotidą  
sujungtą su oligonukleotidu**

**Magistro baigiamasis darbas**

Genetikos studijų programa

**Darbo vadovas**  
Dr. Eglė Merkienė

**Darbo konsultantas**  
Aistė Polikaitytė

Vilnius 2024

## TURINYS

Santrumpos .....	3
Santrauka .....	4
Summary .....	5
Įvadas .....	6
1. Literatūros apžvalga .....	7
1.1. SARS-CoV-2 virusas .....	7
1.1.1. SARS-CoV-2 viruso variantų detekcija ir identifikavimas .....	8
1.1.2. Viso genomo sekoskaita .....	10
1.2. Modifikuoti nukleotidai .....	12
1.3. DNR polimerazių suderinamumas su modifikuotais nukleotidais .....	13
1.4. Modifikuoti dideksinukleotidai .....	13
Asmeninio indėlio aprašymas .....	16
Literatūros Sąrašas .....	16

## SANTRUMPOS

AT-kPGR – atvirkštinės transkripcijos – kiekybinė polimerazės grandininė reakcija

dATP – deoksiadenozino trifosfatas

dd<sup>ON</sup>ATP – dideoksiadenozino trifosfatas sujungtas su oligonukleotidu

dCTP – deoksicitozino trifosfatas

dd<sup>ON</sup>CTP – dideoksicitozino trifosfatas sujungtas su oligonukleotidu

dGTP – deoksiguanozino trifosfatas

dd<sup>ON</sup>GTP – dideoksiguanozino trifosfatas sujungtas su oligonukleotidu

dTTP – deoksitimidino trifosfatas

dd<sup>ON</sup>UTP – dideoksiuridino trifosfatas sujungtas su oligonukleotidu

dNTP – deoksinukleotido trifosfatas

dd<sup>ON</sup>NTP – dideoksinukleotido trifosfatas sujungtas su oligonukleotidu

NKS – naujos kartos sekoskaita

OTDDN – dideoksinukleotidas su prie jo prijungtų oligonukleotidu (angl. *Oligonucleotide tethered 2',3'-dideoxynucleotide*)

PSO – Pasaulio Sveikatos Organizacija (angl. *World Health Organization WHO*)

SSB – vieną grandinę surišantys baltymai (angl. *single strand binding protein*)

VILNIAUS UNIVERSITETAS  
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

Karolis Kumpaitis

**SARS-CoV-2 variantų identifikavimas naudojant 2',3'-Dideoksinukleotidą sujungtą su  
oligonukleotidu**

Magistro baigiamasis darbas

SANTRAUKA

RNR virusai kaip SARS-CoV-2 nepaliaujamai evoliucionuoja dėl replikacijos metu atsirandančių pokyčių genome. Šios genetinės variacijos gali paveikti viruso savybes kaip gebėjimą užkrėsti naujus žmones, sukelti simptomų stiprumą ar atsparumą esantiems gydymo būdams. Dėl to, naujų viruso genominių variantų stebėjimas ir sekimas tampa efektyviu būdu kontroliuoti epidemiją. Šiuo metu, dažniausiai naudojamas metodas SARS-CoV-2 variantų identifikavimui yra viso RNR viruso sekoskaita paremta amplikonais. OTDDN (Dideoksinukleotidas sujungtas su oligonukleotidu) paremta technologija atvėrė naujas galimybes paprastesniam tiksliniam NKS bibliotekų paruošimui, kurio metu tiriamos molekulės (DNR ar RNR) gali būti pagautos ir sekvenuotos naudojant vieną pradmenį. Šio darbo tikslas yra parodyti OTDDN tinkamumą panaudoti virusinių genominių RNR sekoskaitos bibliotekų paruošimui SARS-CoV-2 variantų identifikavimui.

VILNIUS UNIVERSITY  
LIFE SCIENCES CENTER

Karolis Kumpaitis

**SARS-CoV-2 variant identification using Oligonucleotide tethered 2',3'-  
dideoxynucleotide**

Master thesis

SUMMARY

RNA viruses such as SARS-CoV-2 continuously evolve as changes in the genetic code occur during replication of the genome. These genetic variations may impact the properties of the virus such as transmission, severity of symptoms or sensitivity to treatments. Thus, monitoring and detection of new genomic variants is important for efficient epidemic control. Currently, the most widely used method for SARS-CoV-2 variant identification is by sequencing the whole viral RNA genome using an amplicon based system. OTDDN's (Oligo Tethered Dideoxy Nucleotides) technology opened the opportunity for simplified semi-targeted NGS library preparation where molecules of interest (DNA or RNA) can be captured and sequenced using only one primer. The aim of this work is to demonstrate suitability of OTDDNs in viral genomic RNA sequencing library preparation for SARS-CoV-2 RNA variant identification.

## IVADAS

SARS-CoV-2 virusas pirmą kartą detektuotas 2019 metų gruodžio mėnesį, o jau po keturių mėnesių, kovo 12d. 2020 metais paskelbtas Pasaulio Sveikatos Organizacijos kaip pandemija (Singh & Yi, 2021). Šis RNR virusas išplito per visą pasaulį vos per keturis mėnesius ir nors buvo įvesti griežti pandemijos valdymo reikalavimai, SARS-CoV-2 toliau plito ir mutavo (Magazine et al., 2022). Virusui mutuojant atsirado jo variantai, PSO paprasčiau vadinami, pagal graikų abėcėlę: alfa, beta, delta, omikron ir t.t. (Flores-Vega et al., 2022). Dalis šių naujai atsiradusių variantų buvo lengviau užkrečiami, sukėlė stipresnius simptomus, didino viruso galimybes išvengti imuninės sistemos. Šie variantai, siejami su SARS-CoV-2 bangomis, kai vienoje ar kitoje pasaulio vietoje drastiškai pakyla susirgimų kiekis, hospitalizacijų skaičius ar mirčių skaičius (Forchette et al., 2021). Todėl norint suvaldyti šiuos viruso protrūkius būtina atrasti ir sekti naujus viruso RNR variantus, stebėti jų kitimą ir plitimo kryptis. Ši informacija padeda visuomenės sveikatos specialistams priimti reikalingus sprendimus, norint suvaldyti šią tarptautinę krizę (Oude Munnink et al., 2020). SARS-CoV-2 viruso RNR genomo variantų identifikavimui dažniausiai naudojama viso genomo sekoskaita, paremta tiksline daugiataikine PGR amplifikacija (Nasereddin et al., 2022). Šiam naujos kartos sekoskaitos bibliotekos paruošimui naudojamos pradmenų poros, kurių pagalba galima padauginti DNR tik nuo žinomų genomo vietų. Kadangi viruso genome dažnai pasitaiko RNR sekų persitvarkymų, informacija apie juos, naudojant amplikonais paremtą bibliotekų generavimo metodą, gali būti prarandama. Šiai problemai išspręsti gali būti naudojama OTDDN (2',3'-dideoksinukleotidas sujungtas su oligonukleotidu) paremta technologija (Kapustina, 2021a). OTDDN ne tik leidžia paruošti RNR sekoskaitos bibliotekas greičiau, sujungiant fragmentavimo ir kopijinės DNR sintezės žingsnius, tuo pačiu metu pažymint 3' fragmento galą žinomos sekos oligonukleotidu (Kapustina, 2021a). Bet taip pat, bibliotekoms paruošti pakanka tik vieno tikslinio pradmens iš poros, dėl to atsiranda galimybė aptikti viruso genomo sekų variantus bei persitvarkymus.

Darbo tikslas:

Darbo uždaviniai:

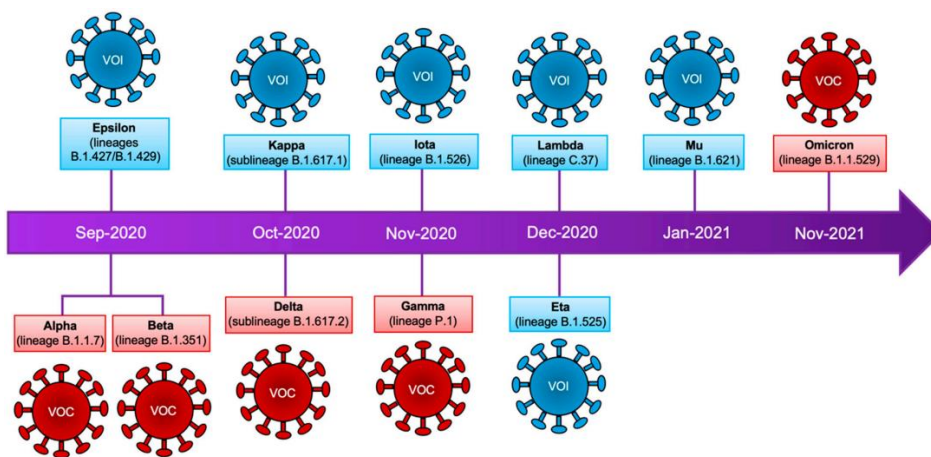
## 1. LITERATŪROS APŽVALGA

### 1.1. SARS-CoV-2 virusas

Pirmą kartą SARS-CoV-2 pastebėtas 2019 metais Uhano mieste, Hubėjaus provincijoje, Kinijoje, sukėlė ūminę viršutinių kvėpavimo takų ligą, pavadintą koronaviruso liga 2019 arba trumpiau COVID-19 (*angl. coronavirus disease 2019 COVID-19*) (Timeline of WHO's Response to COVID-19). SARS-CoV-2 greitai plintant, kovo 11d. 2020 metais Pasaulio Sveikatos Organizacija PSO (*angl. World Health Organisation WHO*) paskelbė COVID-19 pandemiją. Dabartiniiais PSO duomenimis, pasaulyje viso užregistruota daugiau nei 770 milijonų atvejų bei daugiau nei 7 milijonai mirčių nuo COVID-19 (duomenys gegužės 12d. 2024) (COVID-19 Cases | WHO COVID-19 Dashboard).

SARS-CoV-2 plinta oro lašeliniu būdu, per žmonių artimą kontaktą ar buvimą patalpoje su infekuotu žmogumi (Flores-Vega et al., 2022). SARS-CoV-2 globalus paplitimas bei intensyvi replikacija siejama su gebėjimu sparčiai mutuoti. Mutavus SARS-CoV-2, atsiranda nauji jo variantai, kurie dažnai turi mutacijų spyglio baltymo gene. Tokie variantai siejami su didesniu užsikrėtimu, patogeniškumu bei lengvesniu imuninės sistemos išvengimu (Flores-Vega et al., 2022). PSO apibūdina bendrinę virusų variantų skirstymo sistemą - keliantys susirūpinimą (*angl. variants of concern VOC*) ir keliantys susidomėjimą (*angl. variants of interest VOI*) (Updated Working Definitions and Primary Actions for SARS-CoV-2 Variants, 2023). Keliantys susirūpinimą variantai, tai tokios viruso atmainos, kurios yra lengviau perduodamos, virulentiškesnės, sukelia stipresnius simptomus (daugiau hospitalizacijos ir mirčių atvejų), mažesnis vakcinų sukurto imuniteto poveikis. Keliantys susidomėjimą variantai, tai taip pat mutavę virusai, pasižymintys viena ar keliomis savybėmis, kaip ir keliantys susirūpinimą variantai, tačiau per rizikos vertinimą neatitinka vieno iš PSO kriterijų: didelis neigiamas poveikis klinikinių atvejų rimtumui; COVID-19 epidemiologijos pokytis lemiantis sveikatos apsaugos sistemos negebėjimą pasirūpinti pacientais su COVID-19 ar kitomis ligomis; vakcinų sukurto imuniteto efektyvumo didelis sumažėjimas (Updated Working Definitions and Primary Actions for SARS-CoV-2 Variants, 2023).

VOC variantų pavyzdžiai alfa variantas, kuris buvo vienas pirmųjų identifikuotų, besiskiriančių nuo pirmojo Kinijoje identifikuoto SARS-CoV-2 varianto, delta variantas, sukėlęs naują susirgimų bangą, ir paskutinis viruso variantas, plačiai žinomas ir išlikęs iki dabar - omikron (1.1 pav.). Šiuo metu nebėra PSO kvalifikuojamų VOC SARS-CoV-2 viruso variantų. Išlikę yra tik VOI variantai, bendrai vadinami omikron (duomenys gegužės 12 d. 2024). Savalaikis naujų viruso genomo mutacijų atradimas padeda pritaikyti reikalingus visuomenės sveikatos apsaugos įrankius bei padeda identifikuoti reikalingus vakcinų pokyčius, atnaujinimus, bei gali padėti pagerinti diagnostinius tyrimus (Nasereddin et al., 2022). Šie veiksmai padeda valdyti pandemijos plitimą, kontroliuoti susirgimų skaičių ir sumažinti hospitalizacijos bei mirčių atvejų skaičių (Nasereddin et al., 2022).



1.1 pav. SARS-CoV-2 variantų atsiradimo chronologija. Pažymėta PSO klasifikacija. Šaltinis: (Flores-Vega et al., 2022)

### 1.1.1. SARS-CoV-2 viruso variantų detekcija ir identifikavimas

SARS-CoV-2 patenka į ląsteles per spyglio baltyme esantį receptorių sujungiantį domeną (*angl. receptor-binding domain RBD*), kuris sąveikauja su ląstelės paviršiuje esančio angiotenziną konvertuojančio fermento 2 (*angl. angiotensin-converting enzyme 2 ACE2*) receptoriaus motyvu (Forchette et al., 2021). Kaip pavyzdys, viena pirmųjų mutacijų D614G spyglio baltyme padidino viruso infektyvumą bei stabilumą, todėl globaliai randama daugiau G614 nei D614 variantų (Nasereddin et al., 2022). Paskutinis globaliai paplitęs variantas, Omikron, turi daugiau nei 30 naujų mutacijų spyglio baltyme, kurios taip pat rastos Alfa ir Delta variantuose (Flores-Vega et al., 2022). Viena tokių taškinių mutacijų N501Y siejama su geresniu viruso susikabinimu su *ACE2* receptoriumi, dėl ko šis variantas yra lengviau perduodamas (Prévost et al., 2021). Taip pat, Omikron variantas charakterizuojamas kaip galintis išvengti humoralinio atsako dėl ko manoma, kad yra 2,7-3,7 karto užkrečiamesnis nei Delta variantas (Garcia-Beltran et al., 2022).

SARS-CoV-2 virusas yra teigiamas viengrandės RNR virusas priskiriamas koronavirusų šeimai, kurių genomų dydžiai svyruoja nuo 26 iki 32 kb. SARS-CoV-2 viruso gebėjimą greitai



prisitaikyti prie naujų nešiotojų ir kintančios aplinkos sąlygoja viruso gebėjimas mutuoti per trumpą laiką (Bloom et al., 2023). Virusų mutacijų greitį paveikia polimerazių daromos klaidos ir gebėjimas jas taisyti, kiti mutacijų šaltiniai yra nešiotjo fermentai, spontaninės nukleorūgščių pažaidos ir specifiniai genetiniai elementai, kurių funkcija kurti naujas mutacijas (Sanjuán & Domingo-Calap, 2016). Viengrandžiai virusai paprastai greičiau mutuoja dėl to, kad viengrandės nukleorūgštys yra lengviau pažeidžiamos oksidacinės deaminacijos. Kitas RNR virusų mutacijų šaltinis yra tai, kad jie dažnai neturi DNR polimerazių su egzonukleazinių aktyvumu, dėl kurio trūkumo, polimerazės negali ištaisyti nukleotidų nesutapimus. Tačiau šiuo atveju SARS-CoV-2 panašesnis į didesnius genomus turinčius virusus, kuriuose DNR polimerazės turi egzonukleazinį aktyvumą (Sanjuán & Domingo-Calap, 2016). Kitas svarbus aspektas yra virusų rekombinacija, dėl kurios atsiranda mutacijos. SARS-CoV-2 viruse šių elementų yra visame genome, o daugiausiai rekombinacijos atsitikimų randama *ORF1a* regione arba spyglio baltymo N gale (Singh & Yi, 2021). Taip pat virusų mutacijas gali paveikti ir nešiotjo ląstelės (Lamb et al., 2024). Stebinti tris mutacines tendencijas C→U, U→C/A→G, G→U, pastebėta, kad pirmosios tendencijos mutacijų daugiau yra VOC variantuose bei tai tokios mutacijos, kurios keičia aminorūgščių seką (Lamb et al., 2024). Antrosios ir trečiosios tendencijos mutacijos daugiau pastebėtos tik kaip keičiančios RNR seką, taip pat pandemijos laikotarpiu antrosios tendencijos pastebėta daugiau VOC variantuose nei pirmosios (Lamb et al., 2024). Pirmąją tendenciją manoma, kad sukelia APOBEC šeimos citozino deaminazės, antrąją tendenciją ADAR šeimos adenino deaminazės, trečiąją tendenciją sukelia reaktyvios deguonies formos ROS (Lamb et al., 2024).

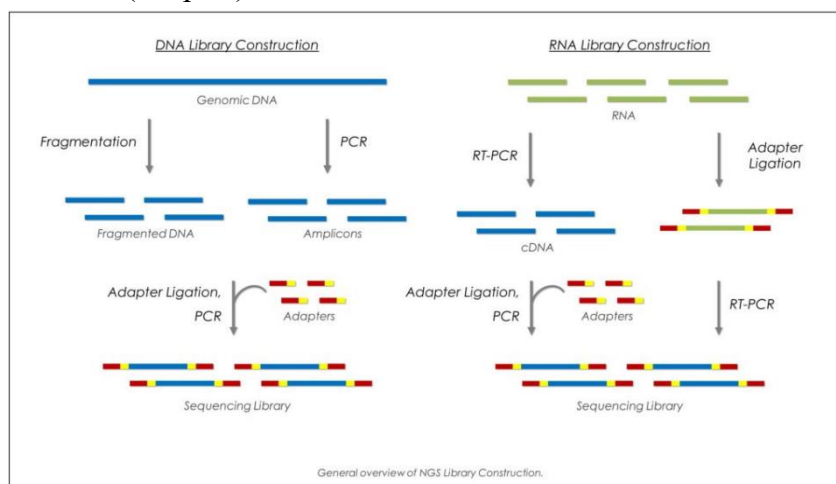
SARS-CoV-2 viruso detekcijai ir viruso sukeltos ligos atvejo patvirtinimui plačiausiai naudojamas molekulinės diagnostikos metodas AT-kPGR, kuris yra laikomas aukso standartu (Eftekhari et al., 2021). AT-kPGR testams naudojami medvilniniu pagaliuku surinkti mėginiai iš pacientų viršutinių kvėpavimo takų. Metodas atliekamas vieno žingsnio principu, kai virusinė RNR yra verčiama kDNR atvirkštinės transkriptazės ir iškart eksponentiškai amplifikuojama DNR polimerazės (Bustin et al., 2022; Eftekhari et al., 2021). Padauginta viruso kopijinė DNR yra realiu laiku detektuojama specialaus zondo skleidžiama fluorescencija, kai šis zondas yra degraduojamas polimerazės 5' – 3' egzonukleazinio aktyvumo, sintetinant naują grandinę. Šiam metodui dažniausiai naudojami pradmenys, taikantys į ORF1b ar ORF8 SARS-CoV-2 genomo regionus, nukleokapsidės, spyglio ar viruso apvalkalo baltymų genus (Bustin et al., 2022; Carter et al., 2020). Nors šis detekcijos metodas yra patogus, specifiškas ir tiksliai gali identifikuoti SARS-CoV-2 virusą, specialios įrangos ir treniruoto personalo kaštai apsunkina diegimą tam tikruose vietose. Todėl kaip alternatyva kuriami kitokiu būdu veikiantys izoterminės amplifikacijos metodai, kaip pvz.: atvirkštinės transkripcijos – kilpinė izoterminė amplifikacija (*angl. Reverse Transcription*

*Loop-Mediated Isothermal Amplification RT-LAMP*), besisukančios kilpos amplifikacija (*angl. Rolling Circle Amplification RCA*) (Carter et al., 2020). Šie metodai nereikalauja brangios įrangos ir yra tinkami nustatyti, ar pacientas yra užsikrėtęs virusu, bei galima detektuoti, kuris SARS-CoV-2 viruso variantas sukėlė infekciją (Ngoc & Lee, 2024). Tačiau pagrindinis AT-kPGR trūkumas yra tas, kad šio tyrimo metu negalima nustatyti dar nežinomų viruso genomo variantų (Ishige, 2024; Moore et al., 2020). Dabartinis viruso variantų tyrimas remiasi brangiais ir daug laiko užimančiais viso genomo sekoskaitos tyrimais (*angl. Whole Genome Sequencing WGS*), naudojantis naujos kartos sekoskaitos platformomis (European Centre for Disease Prevention and Control & World Health Organization, 2021).

### 1.1.2. Viso genomo sekoskaita

Globalaus pasaulio judumas paveikia ir virusų plitimą: viruso nešiotojai gali pasiekti skirtingas pasaulio vietas dar viruso inkubacinio periodo metu (Harrison et al., 2020). Taip virusai pasiekia žmonių populiacijas, kurios anksčiau nėra susidūrusios su naujomis virusų rūšimis, dėl to neturi susidariusio imuniteto kovojančio su virusine infekcija (Harrison et al., 2020). Norint kontroliuoti virusų plitimą, viruso variantų atsiradimą ir mutavimą, vis dažniau naudojama sekoskaitos technologija - ypač viso genomo sekoskaita. Skirtingai nuo kitų prieinamų technologijų, tokių kaip Sangerio, viso genomo sekoskaitos tikslas yra gauti patikimus duomenis apie visą organizmo DNR ar RNR seką (Nieuwenhuijse et al., 2022). Sangerio sekoskaita, nors ir generuoja ilgus fragmentus, tačiau jie nepadengia viso viruso genomo ilgio. Kiekvienas fragmentas yra ruošiamas atskiroje reakcijoje, todėl, norint nuskaityti didelius kiekius DNR ar RNR sekų, reikalingos didelės laiko ir finansų investicijos. Dėl šios priežasties, virusų variantų identifikavimui yra naudojamos masinės lygiagrečios sekų nuskaitymo technologijos, tokios kaip naujos kartos sekoskaita (Nieuwenhuijse et al., 2022; Oude Munnink et al., 2020). Šis sekoskaitos metodas padėjo sekti naujų viruso mutacijų atsiradimą visuomenės sveikatos specialistams, priimantiems sprendimus dėl pandemijos valdymo (Oude Munnink et al., 2020).

Viso genomo sekoskaita yra atliekama keliais būdais: amplikonais paremta sekoskaita ar metagenominė sekoskaita (1.2 pav.).



1.2 pav. Bendrinė DNR ir RNR bibliotekų paruošimo schema. Šaltinis: (Next Generation Sequencing (NGS) | Research at St. Michael's Hospital, 2024)

Amplikonais paremta sekoskaita yra specifiškas ir labai jautrus metodas. Norint atlikti šį metodą reikia pradmenų paletės, paremtos jau turima informacija apie norimą tirti patogeną (Moore et al., 2020; Nasereddin et al., 2022). Ruošiant amplikonais paremtos sekoskaitos biblioteką, pirmiausia yra išgryninama DNR ar RNR iš klinikinių mėginių, kurie surinkti iš pacientų užsikrėtusių virusine infekcija. Tada atliekama DNR sintezė, naudojant specialiai norimiems tirti patogenams sukurtas pradmenų paletes. Jei norimo tirti viruso genomą yra RNR molekulė, tuomet prieš DNR sintezę yra vykdoma atvirkštinė transkripcija ir/ar kartu PGR (1.2 pav.). Toliau standartiškai atliekamas galų tvarkymas ir sekoskaitos adapterių ligavimas (Yoo et al., 2021).

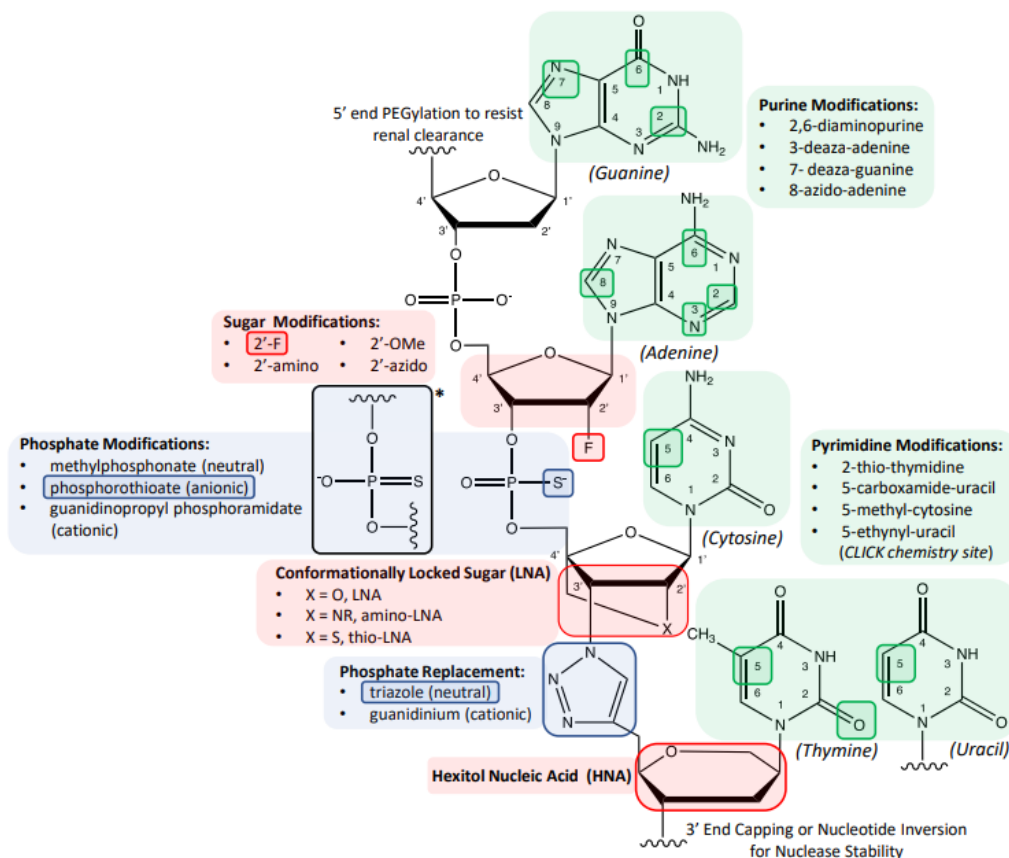
Metagenominės sekoskaitos metu yra nuskaitomi visi DNR ar RNR fragmentai, esantys klinikiniame paciente, užsikrėtusio virusine infekcija mėginyje, todėl nebūtina iš anksto žinoti specifinių patogeno geno sekų (Ng & Kirkness, 2010). Tuo pačiu tai reiškia, kad mėginyje esanti nešiojo ar kitų mikroorganizmų DNR ar RNR bus taip pat nuskaitoma, kas gali lemti sumažėjusį metodo detekcijos limitą. Metagenominė sekoskaita yra atliekama panašiai kaip ir amplikonais paremta sekoskaita, tik RNR atveju, pirmiausia atliekama atvirkštinė transkripcija, panaudojant atsitiktinius pradmenis. Po šios reakcijos, į mėginius pridedama Klenow fragmento, tam, kad būtų susintetinta dviguba DNR grandinė. PGR ar AT-PGR (1.2 pav.) gali būti atliekamas ir su atsitiktiniais pradmenimis (Yoo et al., 2021).

Viso genomo sekoskaitos metodo ar jų variacijos parenkamos pagal norimą atsakyti biologinį klausimą. SARS-CoV-2 atveju metagenominis priėjimas yra parenkamas, kai norima aptikti ne tik virusą, bet tuo pačiu detektuoti ir kitus patogenus bei mikrobiomą, prisidedančius prie COVID-19 ligos rimtumo (Carter et al., 2020). Amplikonais paremta sekoskaita naudojama tikslesniam SARS-

CoV-2 tyrimui, kontaktų sekimui, epidemiologijai ir viruso evoliucijai sekti (Carter et al., 2020). Papildomai šiuos metodus, dabar jau turint SARS-CoV-2 seką, galima naudoti bendrai ir sekti viruso mutacijas (Eftekhari et al., 2021). Šiuos eksperimentus galima atlikti tiek su *Oxford Nanopore Technologies*<sup>TM</sup> MinIon (Moore et al., 2020) ar *Illumina*<sup>TM</sup> NextSeq<sup>TM</sup> serijos instrumentais (*Comprehensive Workflow for Detecting Coronavirus Using Illumina Benchtop Systems*, 2020).

## 1.2. Modifikuoti nukleotidai

Nekanoniniai nukleotidai praturtina DNR ir RNR įvairovę bei prideda antrąjį sluoksnį genetinės informacijos, kuri yra pagrindinis epigenetikos tyrimų objektas (Kapustina, 2021a). Paskutinius dešimtmečius susidomėjimas tokiais nukleotidais itin augo, siekiant juos panaudoti įvairiose srityse: molekulinėje biologijoje (Hertler et al., 2022), epigenetikoje (Chen et al., 2017), terapijoje (Khvorova & Watts, 2017), aptamerų kūrime (Nimjee et al., 2017), biosensoriuose bei kitur (Ochoa & Milam, 2020). Beveik kiekviena nukleotido dalis – nukleobazė, cukraus liekana ar fosfodiesterinės jungties struktūra gali būti modifikuojamos (1.3 pav.) (Ochoa & Milam, 2020).



1.3 pav. Nukleotidų galimos cheminės modifikacijos. Šaltinis: (Ochoa & Milam, 2020)

Norint modifikuoti nukleotido bazę, atliktas pakeitimas turi atitikti keturias taisykles (Kapustina, 2021; Perrin et al., 1999): nukleotidas turi išlaikyti gebėjimą sudaryti vandenilinius ryšius su kitais nukleotidais (Watson-Crick ir Hoogsteen sąveikos); modifikacija turi būti tinkama,

kaip substratas DNR ar RNR polimerazei; trečia - šie nukleotidai DNR ar RNR sintezės metu turi būti įstatomi pakankamai efektyviai ir konkuruoti su atitinkamais kanoniniais nukleotidais; ketvirta, viengrandė DNR su bazių modifikacijomis turi būti tinkamas substratas tolimesniam DNR padauginimui. Bazių modifikacijos taip pat gali paveikti DNR spiralinės struktūros konformacinius pokyčius, modifikacijos pirimidinų C5 pozicijose ar purinų C8 pozicijose padeda lengviau susiformuoti spiralės Z konformacijai ir ją stabilizuoja (Balasubramaniam et al., 2021; Jäger et al., 2005; Liang & Wnuk, 2015). Tačiau bazių modifikacijos, dėl kurių formuojamos papildomos nekovalentinės jungtys su DNR polimerazėmis, mažina modifikuotų bazių inkorporavimą (Zasedateleva et al., 2023).

### 1.3. DNR polimerazių suderinamumas su modifikuotais nukleotidais

Atliekant eksperimentus su nukleorūgštimis, dažnai reikalingas jų padauginimas ar nustatymas mėginyje, kuris taip pat remiasi jų padauginimu (Medžiūnė et al., 2022). Plačiausiai tam naudojama polimerazės grandininė reakcija PGR arba, dirbant su RNR pirmiau atliekama atvirkštinė transkripcija susintetinti DNR (Medžiūnė et al., 2022). Natūraliai polimerazės prisitaikiusios įterpti kanoninius nukleotidus, tačiau modifikuotų nukleotidų įterpimas nėra neįmanomas, net kai modifikacijos yra steriškai nepatogios (Duffy et al., 2020; Hottin & Marx, 2016). Pirimidinų C5 pozicijoje modifikacijos ar 7-deazapurinų modifikacijos C7 pozicijose puikiai tinka inkorporavimui PGR metu, nors pirimidinų C6 pozicijoje modifikacijos ar purinų C8 pozicijoje modifikacijos nėra tokios tinkamos inkorporacijai naudojant DNR polimerazes (Hottin & Marx, 2016). Medžiūnė et al. (2022) pademonstavo, kad, panaudojant dažnai sutinkamas polimerazes molekulinėje biologijoje, galima įterpti modifikuotus nukleotidus į sintetinamą DNR grandinę. Modifikuotų nukleotidų inkorporavimo efektyvumas daug priklauso nuo jų modifikacijos steriškumo (Medžiūnė et al., 2022). Tokiu atveju modifikaciją prie nukleotido būtina prijungti per lanksčią jungtį (Kuwahara et al., 2008). Ši strategija puikiai pritaikyta atlikti sekoskaitą sintezės būdu, kurioje yra naudojami modifikuoti nukleotidai (Guo et al., 2008).

### 1.4. Modifikuoti dideoksinukleotidai

Dideoksinukleotidai, turintys modifikaciją ribozės žiedo 3' pozicijoje, biologijoje yra naudojami sustabdyti DNR polimerazinę reakciją. Tokie nukleotidai, kurie papildomai turi fluoroforo modifikaciją, prikabinantą prie nukleobazės, yra ekstensyviai naudojami Sanger ir naujos kartos sekoskaitoje (pvz. sekoskaitoje sintezės būdu) (Guo et al., 2008; Rosenblum et al., 1997).

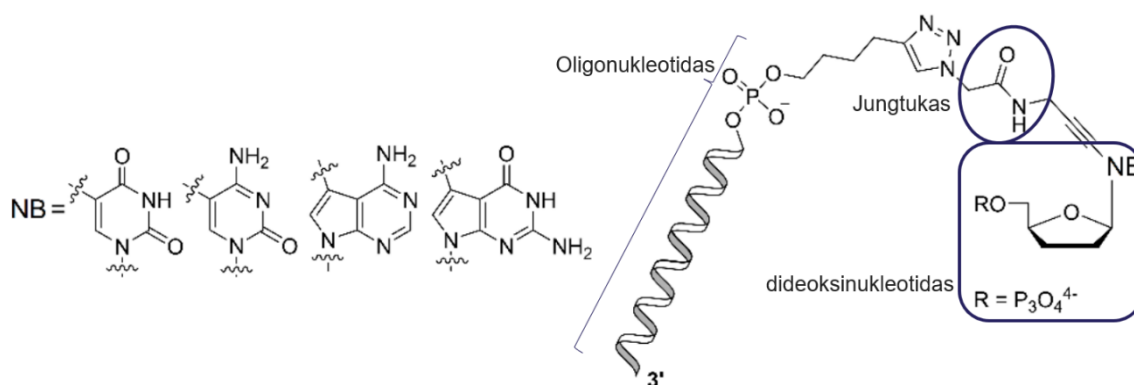
Sanger sekoskaita remiasi pradmens pratęsimo reakcija, kai atsitiktinėse vietose į sintetinamą DNR grandinę yra įstatomi žymėti modifikuoti dideoksinukleotidai. Po reakcijos gaunami įvairaus ilgio fragmentai, kurių 3' gale yra inkorporuoti dideoksinukleotidai (Rosenblum et al., 1997).

Kiekviena skirtinga bazė yra pažymėta skirtingu rodaminu dažu (*angl. Rhodamine dyes*) (R110, REG, TAMRA ir ROX). Sugeneruotus fragmentus galima frakcionuoti kapiliarinės elektroforezės metu ir detektoriumi nustatyti fragmento gale esantį dažo tipą (Slatko et al., 2018). Parinkti dažai sugeria ir išspinduliuoja šviesą optimaliai skirtingose bangų ilgiuose, tačiau skiriasi jų kvantinė išeiga (Kapustina, 2021a). Tai kompensuojama panaudojant energijos perdavimo principą, pridėdant donorinį chromoforą fluoresceiną (FAM) atitinkamu atstumu nuo akceptorinio rodaminu dažo (Kapustina, 2021a). Svarbiausias panaudojimą leidžiantis aspektas yra tai, kad šiuos žymėtus dideoksinukleotidus geba inkorporuoti termostabili DNR polimerazė (*angl. Thermo Sequenase DNA polymerase*) (Kumar & Fuller, 2007).

Naujos kartos sekoskaita remiasi sekoskaita sintezės būdu (*angl. sequencing by synthesis*). Šiam metodui atlikti yra panaudojami nukleotidai, modifikuoti fluorescuojančiu dažu, bei uždengta ribozės žiedo 3' pozicijoje OH grupė (Kapustina, 2021a). Tyrimai parodė, kad šie nukleotidai gali būti efektyviai įjungiami į DNR grandinę, tada nuskaitomas prikabintas dažas, ir abi modifikacijos pašalinamos tris(2-karboksietil)fosfino apdorojimu, tam, kad į tą pačią grandinę galėtų būti inkorporuotas kitas nukleotidas (Guo et al., 2008; Kapustina, 2021a).

Modifikuoti dideoksinukleotidai gali padėti palengvinti naujos kartos sekoskaitos (*angl. next-generation sequencing*) bibliotekų paruošimą. Paruošimo pagrindiniai žingsniai paprastai yra DNR ar RNR fragmentavimas iki atitinkamai platformai reikalingo dydžio fragmentų (75 – 600 bazių porų) (*Next Generation Sequencing (NGS) | Research at St. Michael's Hospital, 2024*). Toliau seka fragmentų galų paruošimas ir adapterio sekų ligavimas. Bendrinis šių protokolų trūkumas yra fermentinis ligavimas, kurio išeiga yra 15-40 % (Aigrain et al., 2016). Dėl prasto efektyvumo prarandama daug sekų, kurios sumažina pradinės bibliotekos įvairovę bei gali iškreipti gautus rezultatus: pakeisti tam tikrų sekų įvertinamą kiekį ir pan (Aigrain et al., 2016). Šiam bibliotekų paruošimui kaip alternatyva galėtų būti „Clickseq“ (1.5 pav. A ir B), kurio metu naudojami azido-2',3'-dideoksinukleotidai atsitiktiniu metu terminuojantys DNR sintezę (Routh et al., 2015). Taip būtų iškart PGR metu formuojami trumpi fragmentai tinkantys sekoskaitai. Tokiems fragmentams toliau būtų atliekama „click-ligated“ DNR oligonukleotidai per 5'-alkino grupę. Paskutinis fragmentų paruošimo etapas būtų padauginti biblioteką ir perskaityti triazolo jungtį tarp dideoksinukleotido ir oligonukleotido. Toks bibliotekų paruošimo būdas leidžia sukurti biblioteką su mažiau klaidų bei sumažinti informacijos praradimą dėl standartinių metodų netikslumo (Routh et al., 2015). Šis metodas apjungė fragmentavimo ir adapterių ligavimo žingsnius, tačiau turi kelis neigiamus aspektus: reikalingas papildomas gryninimas pašalinti visus azido-2',3'-dideoksinukleotidus, cheminiai reakcijai reikalingas didelis kiekis DNR, vario jonų buvimas

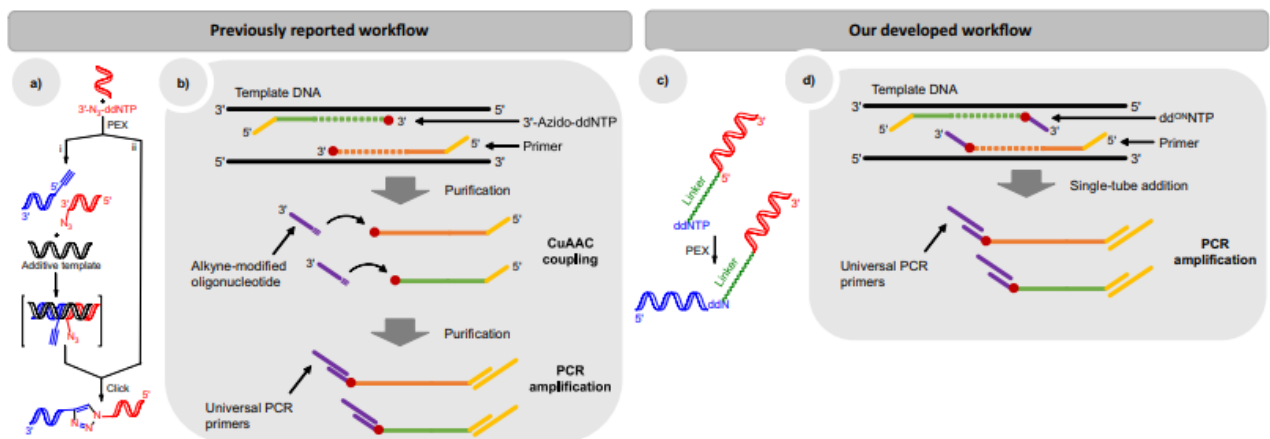
reakcijoje inhibuoja polimerazę bei sukelia DNR degradaciją, perskaitymo reakcijų išeiga yra mažesnė nei 10 % (Medžiūnė et al., 2022).



1.4 pav. OTDDN cheminė struktūra. Adaptuota iš (Kapustina, 2021)

Kapustina (2021) pasiūlyta biblioteka paruošti panašiu būdu, bet pasitelkus modifikuotus dideoksinukleotidus prie kurių yra prijungtas oligonukleotidas (angl. *Oligonucleotide tethered 2',3'-dideoxynucleotide OTDDN*), kuris jau yra paruoštas atlikti DNR fragmentų fragmentavimą bei gali būti naudojamas tolimesnei PGR reakcijai (1.4 pav.). OTDDN sudarantis 2',3'-dideoksinukleotidas skiriasi nuo įprasto deoksinukleotido savo modifikacija deoksiribozės žiede, 3' pozicijoje - dėl šios modifikacijos polimerazė negali toliau pratęsti nukleorūgšties sintezės, nes tam reikalinga 3' pozicijoje esanti hidroksilo grupė (1.4 pav.). Hottin & Marx (2016) naudodamiesi kristolografija įrodė, kad dalis nukleotidų modifikacijų gali patekti į polimerazės aktyvųjį centrą. Remdamiesi šia hipoteze Kapustina (2021) išbandė galimybę paruošti naujos kartos sekoskaitos bibliotekas panaudojant OTDDN (1.5 pav. C ir D). Šiuos dideoksinukleotidus naudojant nukleorūgščių sintezės metu kartu su kanoniniais nukleotidais, OTDDN yra įterpiamas į sintetinamą DNR grandinę atsitiktiniu būdu, todėl gaunami įvairaus ilgio DNR sintezės produktai, kurių 3' gale yra prijungtas žinomos sekos oligonukleotidas. Šiuo būdu yra pakeičiamas DNR ar RNR fragmentavimo žingsnis. Ligavimo žingsnis pakeičiamas atliekant PGR su pradmenimis, kurių sekos yra sekoskaitos

adaptris. Šių pradmenų hibridizavimosi seka tampa oligonukleotidas, prijungtas prie inkorporuoto dideoksinukleotido (Kapustina, 2021).



1.5 pav. A,B – click sekoskaitos bibliotekų paruošimo būdas, C,D – bibliotekų paruošimo metodas panaudojant OTDDN. Šaltinis: (Medžiūnė et al., 2022)

## ASMENINIO INDĖLIO APRAŠYMAS

Rezultatai buvo gauti, analizuoti ir įvertinti studento, Karolio Kumpačio.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

- Aigrain, L., Gu, Y., & Quail, M. A. (2016). Quantitation of next generation sequencing library preparation protocol efficiencies using droplet digital PCR assays - a systematic comparison of DNA library preparation kits for Illumina sequencing. *BMC Genomics*, *17*(1).  
<https://doi.org/10.1186/s12864-016-2757-4>
- Andrews, S. (2010). *FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data* (0.12.0). Babraham Bioinformatics. <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- Balasubramaniam, T., Oh, K. I., Jin, H. S., Ahn, H. Bin, Kim, B. S., & Lee, J. H. (2021). Non-Canonical Helical Structure of Nucleic Acids Containing Base-Modified Nucleotides. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(17). <https://doi.org/10.3390/IJMS22179552>
- Bloom, J. D., Beichman, A. C., Neher, R. A., & Harris, K. (2023). *Evolution of the SARS-CoV-2 Mutational Spectrum*. <https://doi.org/10.1101/2022.09.27.509649>
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *30*(15), 2114–2120.  
<https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTU170>



- Bustin, S. A., Shipley, G. L., Kirvell, S., Mueller, R., & Nolan, T. (2022). RT-qPCR Detection of SARS-CoV-2: No Need for a Dedicated Reverse Transcription Step. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3). <https://doi.org/10.3390/IJMS23031303>
- Carter, L. J., Garner, L. V., Smoot, J. W., Li, Y., Zhou, Q., Saveson, C. J., Sasso, J. M., Gregg, A. C., Soares, D. J., Beskid, T. R., Jervey, S. R., & Liu, C. (2020). Assay Techniques and Test Development for COVID-19 Diagnosis. *ACS Central Science*, 6(5), 591–605. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.0c00501>
- Chen, Y., Hong, T., Wang, S., Mo, J., Tian, T., & Zhou, X. (2017). Epigenetic modification of nucleic acids: from basic studies to medical applications. *Chemical Society Reviews*, 46(10), 2844–2872. <https://doi.org/10.1039/C6CS00599C>
- Comprehensive workflow for detecting coronavirus using Illumina benchtop systems.* (2020). <https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/appnotes/ngs-coronavirus-app-note-1270-2020-001.pdf>
- COVID-19 cases* | *WHO COVID-19 dashboard*. Retrieved May 12, 2024, from <https://data.who.int/dashboards/covid19/cases?n=c>
- Danecek, P., Bonfield, J. K., Liddle, J., Marshall, J., Ohan, V., Pollard, M. O., Whitwham, A., Keane, T., McCarthy, S. A., & Davies, R. M. (2021). Twelve years of SAMtools and BCFtools. *GigaScience*, 10(2). <https://doi.org/10.1093/GIGASCIENCE/GIAB008>
- Drazdauskienė, U., Kapustina, Ž., Medžiūnė, J., Dubovskaja, V., Sabaliauskaitė, R., Jarmalaitė, S., & Lubys, A. (2023). Fusion sequencing via terminator-assisted synthesis (FTAS-seq) identifies TMPRSS2 fusion partners in prostate cancer. *Molecular Oncology*, 17(6), 993–1006. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.13428>
- Duffy, K., Arangundy-Franklin, S., & Holliger, P. (2020). Modified nucleic acids: replication, evolution, and next-generation therapeutics. *BMC Biology*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/S12915-020-00803-6>
- Eftekhari, A., Alipour, M., Chodari, L., Dizaj, S. M., Ardalan, M. R., Samiei, M., Sharifi, S., Vahed, S. Z., Huseynova, I., Khalilov, R., Ahmadian, E., & Cucchiaroni, M. (2021). A comprehensive review of detection methods for SARS-CoV-2. *Microorganisms*, 9(2), 1–18. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020232>

- European Centre for Disease Prevention and Control, & World Health Organization. (2021). *Methods for the detection and identification of SARS-CoV-2 variants*.  
<https://www.who.int/europe/publications/i/item/WHO-EURO-2021-2148-41903-57493>
- Flores-Vega, V. R., Monroy-Molina, J. V., Jiménez-Hernández, L. E., Torres, A. G., Santos-Preciado, J. I., & Rosales-Reyes, R. (2022). SARS-CoV-2: Evolution and Emergence of New Viral Variants. In *Viruses* (Vol. 14, Issue 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/v14040653>
- Forchette, L., Sebastian, W., & Liu, T. (2021). A Comprehensive Review of COVID-19 Virology, Vaccines, Variants, and Therapeutics. *Current Medical Science*, 41(6), 1037–1051.  
<https://doi.org/10.1007/s11596-021-2395-1>
- Garcia-Beltran, W. F., St. Denis, K. J., Hoelzemer, A., Lam, E. C., Nitido, A. D., Sheehan, M. L., Berrios, C., Ofoman, O., Chang, C. C., Hauser, B. M., Feldman, J., Roederer, A. L., Gregory, D. J., Poznansky, M. C., Schmidt, A. G., Iafrate, A. J., Naranbhai, V., & Balazs, A. B. (2022). mRNA-based COVID-19 vaccine boosters induce neutralizing immunity against SARS-CoV-2 Omicron variant. *Cell*, 185(3), 457-466.e4. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2021.12.033>
- Guo, J., Xu, N., Li, Z., Zhang, S., Wu, J., Hyun Kim, D., Sano Marma, M., Meng, Q., Cao, H., Li, X., Shi, S., Yu, L., Kalachikov, S., Russo, J. J., Turro, N. J., & Ju, J. (2008). *Four-color DNA sequencing with 3-O-modified nucleotide reversible terminators and chemically cleavable fluorescent dideoxynucleotides*. [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0804023105](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0804023105)
- Harrison, A. G., Lin, T., & Wang, P. (2020). Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. In *Trends in Immunology* (Vol. 41, Issue 12, pp. 1100–1115). Elsevier Ltd.  
<https://doi.org/10.1016/j.it.2020.10.004>
- Hertler, J., Slama, K., Schober, B., Özrendeci, Z., Marchand, V., Motorin, Y., & Helm, M. (2022). Synthesis of point-modified mRNA. *Nucleic Acids Research*, 50(20), e115.  
<https://doi.org/10.1093/NAR/GKAC719>
- Hottin, A., & Marx, A. (2016). Structural Insights into the Processing of Nucleobase-Modified Nucleotides by DNA Polymerases. In *Accounts of Chemical Research* (Vol. 49, Issue 3, pp. 418–427). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.5b00544>
- Ishige, T. (2024). Molecular biology of SARS-CoV-2 and techniques of diagnosis and surveillance. *Advances in Clinical Chemistry*, 118, 35–85. <https://doi.org/10.1016/BS.ACC.2023.11.003>

- Jäger, S., Rasched, G., Kornreich-Leshem, H., Engeser, M., Thum, O., & Famulok, M. (2005). A versatile toolbox for variable DNA functionalization at high density. *Journal of the American Chemical Society*, *127*(43), 15071–15082. <https://doi.org/10.1021/ja051725b>
- Jakubovska, J., Tauraite, D., Birštonas, L., & Meškys, R. (2018). N 4 -acyl-2'-deoxycytidine-5'-triphosphates for the enzymatic synthesis of modified DNA. *Nucleic Acids Research*, *46*(12), 5911–5923. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKY435>
- Kapustina, Ž. (2021). *The utility of modified nucleotides for high-throughput nucleic acid analysis* [Doctoral Dissertation, Vilnius University]. <https://doi.org/10.15388/vu.thesis.248>
- Kapustina, Ž., Jasponė, A., Dubovskaja, V., Mackevičius, G., & Lubys, A. (2021). Enzymatic Synthesis of Chimeric DNA Oligonucleotides by in Vitro Transcription with dTTP, dCTP, dATP, and 2'-Fluoro Modified dGTP. *ACS Synthetic Biology*, *10*(7), 1625–1632. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.1c00112>
- Kapustina, Ž., Medžiūnė, J., Alzbutas, G., Rokaitis, I., Matjošaitis, K., Mackevičius, G., Žeimytė, S., Karpus, L., & Lubys, A. (2021). High-resolution microbiome analysis enabled by linking of 16S rRNA gene sequences with adjacent genomic contexts. *Microbial Genomics*, *7*(9). <https://doi.org/10.1099/MGEN.0.000624>
- Kapustina, Ž., Medžiūnė, J., Dubovskaja, V., Matjošaitis, K., Žeimytė, S., & Lubys, A. (2022). Sensitive and accurate analysis of gene expression signatures enabled by oligonucleotide-labelled cDNA. *RNA Biology*, *19*(1), 774–780. <https://doi.org/10.1080/15476286.2022.2078093>
- Khvorova, A., & Watts, J. K. (2017). The chemical evolution of oligonucleotide therapies of clinical utility. *Nature Biotechnology*, *35*(3), 238. <https://doi.org/10.1038/NBT.3765>
- Kumar, S., & Fuller, C. W. (2007). Advances in Dye-Nucleotide Conjugate Chemistry for DNA Sequencing. *Perspectives in Bioanalysis*, *2*, 119–149. [https://doi.org/10.1016/S1871-0069\(06\)02004-0](https://doi.org/10.1016/S1871-0069(06)02004-0)
- Kuwahara, M., Obika, S., Nagashima, J. I., Ohta, Y., Suto, Y., Ozaki, H., Sawai, H., & Imanishi, T. (2008). Systematic analysis of enzymatic DNA polymerization using oligo-DNA templates and triphosphate analogs involving 2',4'-bridged nucleosides. *Nucleic Acids Research*, *36*(13), 4257–4265. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn404>
- Lamb, K. D., Luka, M. M., Saathoff, M., Orton, R. J., Phan, M. V. T., Cotten, M., Yuan, K., & Robertson, D. L. (2024). Mutational signature dynamics indicate SARS-CoV-2's evolutionary

- capacity is driven by host antiviral molecules. *PLOS Computational Biology*, 20(1).  
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PCBI.1011795>
- Li, H. (2013). *Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM*.  
<https://arxiv.org/abs/1303.3997v2>
- Liang, Y., & Wnuk, S. F. (2015). Modification of purine and pyrimidine nucleosides by direct C-H bond activation. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 20(3), 4874–4901.  
<https://doi.org/10.3390/MOLECULES20034874>
- Magazine, N., Zhang, T., Wu, Y., McGee, M. C., Veggiani, G., & Huang, W. (2022). Mutations and Evolution of the SARS-CoV-2 Spike Protein. *Viruses*, 14(3).  
<https://doi.org/10.3390/V14030640>
- Medžiūnė, J., Kapustina, Ž., Žeimytė, S., Jakubovska, J., Sindikevičienė, R., Čikotienė, I., & Lubys, A. (2022). Advanced preparation of fragment libraries enabled by oligonucleotide-modified 2',3'-dideoxynucleotides. *Communications Chemistry*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/s42004-022-00649-9>
- Moore, S. C., Penrice-Randal, R., Alruwaili, M., Randle, N., Armstrong, S., Hartley, C., Haldenby, S., Dong, X., Alrezaihi, A., Almsaud, M., Bentley, E., Clark, J., García-Dorival, I., Gilmore, P., Han, X., Jones, B., Luu, L., Sharma, P., Shawli, G., ... Hiscox, J. A. (2020). Amplicon-based detection and sequencing of SARS-CoV-2 in nasopharyngeal swabs from patients with COVID-19 and identification of deletions in the viral genome that encode proteins involved in interferon antagonism. *Viruses*, 12(10). <https://doi.org/10.3390/V12101164>
- Nasereddin, A., Golan Berman, H., Wolf, D. G., Oiknine-Djian, E., & Adar, S. (2022). Identification of SARS-CoV-2 Variants of Concern Using Amplicon Next-Generation Sequencing. *Microbiology Spectrum*, 10(4). <https://doi.org/10.1128/spectrum.00736-22>
- Next Generation Sequencing (NGS) | Research at St. Michael's Hospital*. (2024).  
<https://research.unityhealth.to/staff-services/research-facilities/facilities/molecular-biology-core/next-generation-sequencing-ngs/>
- Ng, P. C., & Kirkness, E. F. (2010). Whole genome sequencing. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 628, pp. 215–226). Humana Press Inc. [https://doi.org/10.1007/978-1-60327-367-1\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-367-1_12)
- Ngoc, L. T. N., & Lee, Y. C. (2024). Current Trends in RNA Virus Detection via Nucleic Acid Isothermal Amplification-Based Platforms. *Biosensors*, 14(2).  
<https://doi.org/10.3390/BIOS14020097>

- Nieuwenhuijse, D. F., van der Linden, A., Kohl, R. H. G., Sikkema, R. S., Koopmans, M. P. G., & Oude Munnink, B. B. (2022). Towards reliable whole genome sequencing for outbreak preparedness and response. *BMC Genomics*, *23*(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08749-5>
- Nimjee, S. M., White, R. R., Becker, R. C., & Sullenger, B. A. (2017). Aptamers as Therapeutics. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *57*, 61. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-PHARMTOX-010716-104558>
- Ochoa, S., & Milam, V. T. (2020). Modified nucleic acids: Expanding the capabilities of functional oligonucleotides. In *Molecules* (Vol. 25, Issue 20). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules25204659>
- Oude Munnink, B. B., Nieuwenhuijse, D. F., Stein, M., O'Toole, Á., Haverkate, M., Mollers, M., Kamga, S. K., Schapendonk, C., Pronk, M., Lexmond, P., van der Linden, A., Bestebroer, T., Chestakova, I., Overmars, R. J., van Nieuwkoop, S., Molenkamp, R., van der Eijk, A. A., GeurtsvanKessel, C., Vennema, H., ... Hoebe, C. (2020). Rapid SARS-CoV-2 whole-genome sequencing and analysis for informed public health decision-making in the Netherlands. *Nature Medicine*, *26*(9), 1405–1410. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0997-y>
- Perales, C., Cava, F., Meijer, W. J. J., & Berenguer, J. (2003). Enhancement of DNA, cDNA synthesis and fidelity at high temperatures by a dimeric single-stranded DNA-binding protein. *Nucleic Acids Research*, *31*(22), 6473. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKG865>
- Perrin, D. M., Garestier, T., & Hélène, C. (1999). Expanding the catalytic repertoire of nucleic acid catalysts: Simultaneous incorporation of two modified deoxyribonucleoside triphosphates bearing ammonium and imidazolyl functionalities. *Nucleosides and Nucleotides*, *18*(3), 377–391. <https://doi.org/10.1080/15257779908043083>
- Prévost, J., Richard, J., Asser, R., Ding, S., Fage, C., Anand, S. P., Adam, D., Vergara, N. G., Auzin, A., Benlarbi, M., Gong, S. Y., Ouyette, G., Privé, A., Moreira, S., Charest, H., Roger, M., Mothes, W., Pazgier, M., Brochiero, E., ... Finzi, A. (2021). Impact of temperature on the affinity of SARS-CoV-2 Spike glycoprotein for host ACE2. *The Journal of Biological Chemistry*, *297*(4). <https://doi.org/10.1016/J.JBC.2021.101151>
- Rosenblum, B. B., Lee, L. G., Spurgeon, S. L., Khan, S. H., Menchen, S. M., Heiner, C. R., & Chen, S. M. (1997). New dye-labeled terminators for improved DNA sequencing patterns. *Nucleic Acids Research*, *25*(22), 4500–4504. <https://doi.org/10.1093/NAR/25.22.4500>

- Routh, A., Head, S. R., Ordoukhanian, P., & Johnson, J. E. (2015). ClickSeq: Fragmentation-Free Next-Generation Sequencing via Click Ligation of Adaptors to Stochastically Terminated 3'-Azido cDNAs. *Journal of Molecular Biology*, *427*(16), 2610–2616.  
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.06.011>
- Sanjuán, R., & Domingo-Calap, P. (2016). Mechanisms of viral mutation. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 73, Issue 23, pp. 4433–4448). Birkhauser Verlag AG.  
<https://doi.org/10.1007/s00018-016-2299-6>
- Singh, D., & Yi, S. V. (2021). On the origin and evolution of SARS-CoV-2. In *Experimental and Molecular Medicine* (Vol. 53, Issue 4, pp. 537–547). Springer Nature.  
<https://doi.org/10.1038/s12276-021-00604-z>
- Slatko, B. E., Gardner, A. F., & Ausubel, F. M. (2018). Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Current Protocols in Molecular Biology*, *122*(1), e59.  
<https://doi.org/10.1002/CPMB.59>
- Song, C., & Chen, H. (2020). Overview of research on fusion genes in prostate cancer. *Translational Cancer Research*, *9*(3), 1998. <https://doi.org/10.21037/TCR.2020.01.34>
- Spiess, A. N., & Ivell, R. (2002). A highly efficient method for long-chain cDNA synthesis using trehalose and betaine. *Analytical Biochemistry*, *301*(2), 168–174.  
<https://doi.org/10.1006/abio.2001.5474>
- Thorvaldsdóttir, H., Robinson, J. T., & Mesirov, J. P. (2013). Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Briefings in Bioinformatics*, *14*(2), 178–192. <https://doi.org/10.1093/BIB/BBS017>
- Timeline of WHO's response to COVID-19*. Retrieved May 12, 2024, from <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/interactive-timeline#!>
- Tolle, F., Wilke, J., Wengel, J., & Nter Mayer, G. (2014). By-Product Formation in Repetitive PCR Amplification of DNA Libraries during SELEX. *PLoS One*.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114693>
- Updated working definitions and primary actions for SARS-CoV-2 variants*. (2023).
- Varadharajan, B., & Parani, M. (2021). DMSO and betaine significantly enhance the PCR amplification of ITS2 DNA barcodes from plants. *Genome*, *64*(3), 165–171.  
<https://doi.org/10.1139/GEN-2019-0221>

Yoo, H. M., Kim, I. H., & Kim, S. (2021). Nucleic acid testing of sars-cov-2. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 11). MDPI.  
<https://doi.org/10.3390/ijms22116150>

Zasedateleva, O. A., Surzhikov, S. A., Kuznetsova, V. E., Shershov, V. E., Barsky, V. E., Zasedatelev, A. S., & Chudinov, A. V. (2023). Non-Covalent Interactions between dUTP C5-Substituents and DNA Polymerase Decrease PCR Efficiency. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(17), 13643. <https://doi.org/10.3390/IJMS241713643/S1>