

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras

Biomokslų institutas

Botanikos ir genetikos katedra



NERINGA SORAKAITĖ

Genetikos magistro studijų baigiamasis darbas

**Endonukleazės imobilizacija ant kieto paviršiaus
ir pritaikymas Naujos Kartos Sekoskaitoje**

Darbas atliktas UAB „Thermo Fisher Scientific Baltics“ Vilniaus padalinyje

Darbo vadovai:

Renata Bružaitė

Dr. Arūnas Lagunavičius

Vilnius 2020

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

Neringa Sorakaitė

Endonukleazės imobilizacija ant kieto paviršiaus ir pritaikymas Naujos Kartos
Sekoskaitoje

SANTRAUKA

Naujos kartos sekoskaita (NKS) – plačiai medicinoje ir moksliniuose tyrimuose taikomas nukleorūgčių sekos nustatymo procesas. Vienas iš NKS pritaikymų – viso genomo sekoskaitos (VGS) metodas, kurio metu nustatoma pilna organizmo DNR seka. Šis metodas susideda iš trijų pagrindinių etapų: DNR bibliotekos paruošimo, sekoskaitos ir duomenų analizės. DNR bibliotekų paruošimo etape svarbiausi yra DNR fragmentavimo ir sekoskaitos platformai pritaikytų adaptorinių DNR sekų įvedimo žingsniai. Viso genomo sekoskaitą atliekant neretai susiduriama su netolygiu genomo perdengimu priklausomai nuo DNR GC sąstato (angl. GC bias). Remiantis literatūros šaltinių duomenimis, viena pagrindinių šio reiškinio priežasčių yra DNR bibliotekos ruošimo metu atliekamos reakcijos, kurioms reikalinga aukšta temperatūra (~65°C). Adaptorines DNR sekas liguojant prie 3'- dA turinčių DNR fragmentų, aukštoje temperatūroje įprastai vykdomas dA pridėjimas, o tiriamosios DNR fragmentaciją atliekant su endonukleazėmis, aukšta temperatūra reikalinga šių endonukleazių termininei inaktyvacijai. Šiame darbe parodyta, kaip pasitelkiant endonukleazių imobilizavimo ant kietų paviršių strategiją galima nesudėtingai pašalinti endonukleazę iš fragmentavimo reakcijos mišinio. Tokiu būdu išvengiama terminės endonukleazių inaktyvacijos arba darbui ir laikui imlaus DNR valymo iš fragmentacijos reakcijos mišinio. Taip pat darbe įvertinama galimybė dA pridėjimo reakciją atlikti žemesnėje negu įprastai temperatūroje.

VILNIUS UNIVERSITY

LIFE SCIENCE CENTER

Neringa Sorakaitė

Endonuclease immobilization on a solid-surface and application in Next-
Generation Sequencing

SUMMARY

Next Generation Sequencing (NGS) is a nucleic acid sequencing process broadly used in medicine and scientific researches. One of the NGS applications is a whole genome sequencing (WGS) method, in which the complete DNA sequence of the organism is determined. This method consists of three main steps: DNA library preparation, sequencing, and data analysis. The most important steps in the DNA library preparation phase are the DNA fragmentation and introduction of sequencing platform-specific DNA adaptors. While performing WGS it is often encountered with uneven genome coverage which depends on GC content of DNA (GC bias). According to the literature, one of the major causes for this occurrence is that DNA libraries are prepared using reactions, which require high temperature (~65 °C). When platform-specific adaptors are introduced during ligation process, DNA fragment ends first need to undergo dA-addition reaction that is performed at high temperature. Also if DNA fragmentation is performed with endonuclease, high temperature is required to inactivate the enzyme. This thesis focuses on strategy of endonuclease immobilization on solid surface to easily remove endonuclease from further reactions, thus avoiding thermal inactivation of enzyme or labour and time consuming purification of DNA from fragmentation mixture. The thesis also evaluates the possibility of performing the dA-addition reaction at a lower temperatures.