

Выделение митохондриальной ДНК человека высокой степени очистки для секвенирования на платформах NGS

М.А. Татаркина, В.В. Лобанова
Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград, Россия
E-mail: tatarkina.maria.al@gmail.com

Старение – сложный процесс, зависящий от большого количества факторов. На сегодняшний день мутации в митохондриальном геноме выделяют как один из главных факторов старения, т. к. с возрастом их становится больше. Это приводит к проявлению фенотипических признаков, таких как нейродегенерация и мышечная дистрофия. Высокая скорость мутаций и внутриклеточный отбор способствуют накоплению «эгоистичных» мутаций и становлению реактивного митохондриального генома.

Для исследования мутаций в митохондриях необходимо секвенировать полную последовательность мтДНК, используя два кардинально разных подхода: подготовка библиотеки без этапа амплификации, чтобы избежать накопления ошибок полимеразы и сопутствующего PCR-bias (преимущественного накопления одного из продуктов амплификации), «маскирующего» реальное соотношение частот аллелей для коротких инделов и SNV (однонуклеотидных вариантов); «длинные прочтения», которые позволяют однозначно и достоверно идентифицировать длинные инделы по 100–400 пар оснований и обширные делеции в несколько тысяч пар оснований. Лучше всего для такой задачи подходят платформы секвенирования нового поколения (NGS). Например, Oxford Nanopore, PacBio Sentinel, Illumina или платформа BGI(MGI).

Мы адаптировали несколько методик для обогащения митохондриальных фракций и очистки мтДНК так, что в результате становится возможным получение 80–100 мг митохондрий и около 500 нг мтДНК, практически свободных от примесей рНК и фрагментов ядерного генома. Для оценки степени чистоты фракции человеческой мтДНК от примесей ядерного генома адаптировали методику ПЦР-скрининга по участку гена бета-актина и Alu-повторам в человеческом геноме. Разработали метод количественной оценки числа копий мтДНК для нормализации количества геномного материала в образцах, которые затем используются для подготовки библиотек для секвенирования на платформах NGS.

Возьмите на заметку:

Для исследования мутаций в мтДНК с помощью NGS необходимо подготовить фракцию мтДНК, обогащенную относительно ядерной ДНК в сотни раз. Для этого важно произвести многоступенчатую процедуру очистки, а также выполнить контроль качества.

