



РАЗНООБРАЗИЕ СПОСОБОВ ПОЛУЧЕНИЯ СЛУЧАЙНЫМ ОБРАЗОМ ФРАГМЕНТИРОВАННОЙ ДНК

Матниязов Р.Т.¹, Чемерис Д.А.¹, Кулуев А.Р.¹, Зубов В.В.², Чемерис А.В.¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук
Россия, Республика Башкортостан, 450054, г. Уфа, пр. Октября, 71

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук», Пушкино

Резюме

Показано разнообразие методов случайной фрагментации молекул ДНК под воздействием физических факторов, химических агентов, расщеплением различными ферментами и их смесями, а также путем амплификации с помощью ПЦР с неспецифическими праймерами. Уделено внимание коммерчески производимым устройствам, приборам и наборам для фрагментации ДНК для целей полногеномного секвенирования. Кратко рассмотрена история вопроса фрагментации ДНК. Цитированная литература преимущественно методического плана охватывает более, чем 70-ти летний период.

Ключевые слова: ДНК, фрагментация, геном, секвенирование, полногеномное секвенирование, гидродинамический удар, кавитация, небулизация, ультразвуковое воздействие, ПЦР, ДНКаза, транспозаза, dsDNA Fragmentase, Nextera, MuSeek

Введение

Большинство современных методов секвенирования ДНК новых поколений требуют наличия множества небольших фрагментов ДНК определенного размера, зависящего от типа применяемого ДНК-секвенатора (технологии секвенирования), а также от конкретных наборов для секвенирования. При этом для задач определения нуклеотидных последовательностей полных геномов необходимо наличие фрагментов ДНК, как можно более равномерно «покрывающих» весь геном. Современные технологии полногеномного секвенирования ДНК таковы, что размеры геномов исследуемых видов весьма заметно влияют на необходимость применения в каждом конкретном случае случайной или избирательной фрагментации молекул ДНК. Так, нынешние возможности секвенирования полных геномов эубактерий и архей, имеющих в среднем геномные размеры в диапазоне от 500 т.п.н. до 10 млн.п.н., уже не предполагают определение последовательности нуклеотидов лишь какой-то части их геномов, поскольку позволяют «прочитать» его весь. В этой связи необходимо иметь пригодные для секвенирования тем или иным

методом фрагменты ДНК, покрывающие секвенируемый геном наиболее оптимальным образом, не допуская какой-либо избирательности (неравномерности) в представленности тех или иных участков. (Можно заметить, что для методов полногеномного секвенирования ДНК, в основе которых лежит массивный параллелизм, может иметь место и другая избирательность в виде различий в эффективности амплификации различных участков ДНК, но так как к теме данной статьи это отношения не имеет, то внимания этому вопросу нами здесь уделяться не будет.) Что касается весьма крупных геномов высших организмов, то возможности существующих методов секвенирования ДНК пока не позволяют определять их последовательности также относительно легко как для микроорганизмов, в связи с чем в отдельных случаях экспериментаторы вполне могут обходиться фрагментарной информацией лишь о части геномов таких видов организмов, тем более, если вся последовательность данного генома уже известна для одной или нескольких особей и стоит задача выявления отличий (полиморфизма), например, в кодирующих областях. При этом требования к случайному

характеру фрагментации ДНК в большинстве случаев ничуть не снижаются.

Необходимость работы с фрагментами ДНК определенных размеров возникла задолго до появления методов секвенирования ДНК и полногеномного секвенирования и поэтому ряд ныне используемых для фрагментации ДНК подходов уходит корнями в конец 50-х, 60-ые и 70-ые гг. прошлого столетия и поскольку, слегка перефразируя известную поговорку можно сказать, что многое из нового есть подзабытое старое, то стоит в данной статье немного коснуться и истории данного вопроса.

Под фрагментацией ДНК обычно подразумевается возникновение двуцепочечных разрывов в непосредственной близости друг от друга, так что могут образовываться фрагменты с 5'-, 3'-выступающими, а также с тупыми концами. Все способы фрагментации молекул ДНК можно подразделить на методы ферментативного разрушения и физического воздействия различными факторами. При этом истинно физические причины разрывов цепей ДНК с приведением формул нами здесь вскрываться не будут. К сожалению, разрушение молекул ДНК любыми методами невозможно четко контролировать и поэтому нужный для дальнейшей работы диапазон фрагментов ДНК необходимо отбирать из всего пула обломков с помощью подходящего метода. Практически каждый используемый способ разрушения ДНК позволяет генерировать фрагменты ДНК различных размеров, что зависит как от времени обработки и прилагаемых усилий в виде направляемой энергии, так и от количества разрушающих агентов и других особенностей и поэтому при описании результатов, изложенных в конкретных цитируемых статьях мы сознательно не акцентировали (за редкими исключениями) внимание на этих вопросах. Фракционирование фрагментированной ДНК для целей секвенирования ведется, как правило, с помощью электрофореза в агарозных или полиакриламидных гелях в зависимости от ожидаемых (желаемых) размеров ДНК, но при этом сейчас фактически однотипно для по-разному разрушенных молекул ДНК и поэтому также останется здесь за пределами рассмотрения. При этом в ранних экспериментах по фрагментации ДНК размер получающихся молекул оценивался преимущественно с помощью аналитического ультрацентрифугирования, электронной микроскопией, по соотношению тотального фосфора к 5'-концевому, некоторыми другими также уже устаревшими теперь методами.

Прежде чем перейти к способам разрушения ДНК *in vitro* надо напомнить размеры

этой молекулы. Так, диаметр двойной спирали примерно равен 2,0 нм, а один виток, формирующийся 10,5 нуклеотидами, имеет также примерный размер 3,3 нм. Исходя из этого, можно рассчитать, что, например, ДНК фага лямбда размером 48,5 т.п.н. будет иметь длину около 15 мкм, и соотношение длины к толщине составит в этом случае около 7,5 тысяч раз. Для кольцевой хромосомы бактерии кишечной палочки *Escherichia coli* такое соотношение превысит 700 тыс. раз. ДНК наиболее крупных хромосом человека длиннее своего диаметра приблизительно в 40 млн. раз. Нетрудно представить, что при таких соотношениях длины и диаметра сохранить свою нативность в изолированном виде в растворе ДНК не в состоянии, несмотря на то, что данная молекула считается вполне гибкой [Hagerman, 1988]. Тем не менее, различные физические воздействия при обращении с ДНК способны фрагментировать цельные молекулы на части, размер которых зависит от разных обстоятельств.

Фрагментация молекул ДНК механическими (физическими) воздействиями

Считается, что методы физического разрушения цепей ДНК носят более случайный характер, нежели ферментативное расщепление, хотя можно предположить, что из-за неизбежных различий в нуклеотидных последовательностях могут иметься, условно говоря, «более слабые» места, где межнуклеотидные фосфодиэфирные связи в ДНК будут «рваться» чаще и тому в литературе имеются подтверждения [Гроховский, 2006; Гроховский и др., 2008; Nechipurenko et al., 2009; Grokhovsky et al., 2011]. Так, этими авторами в целой серии работ было обнаружено, что наиболее вероятны разрывы в динуклеотидах CG¹ и CA. Проведя компьютерный анализ прочтений при секвенировании порушенной физическими воздействиями ДНК нескольких организмов различных уровней генетической сложности, проведенных в разных секвенирующих центрах, эти же авторы получили подтверждение своим первоначальным результатам [Poptsova et al., 2014]. Надо сказать, что места разрывов в результате различных физических воздействий на ДНК интересовали исследователей и раньше [Bertazzoni, 1975], но в отсутствии тогда удобного метода секвенирования ДНК получить эту информацию было непросто.

¹ Здесь и далее по тексту нуклеотидные последовательности приведены в направлении 5'→3'.

Одной из главных причин механического разрушения ДНК, находящейся в водном растворе, служит гидродинамический удар, но его возникновение может быть следствием разных воздействий, при которых происходят перепады давления в соответствующих системах, вызванные быстрыми изменениями скоростей потока жидкости. Также гидродинамический удар возникает при явлении кавитации (от лат. *cavita* — пустота), возникающей или в результате местного понижения давления в жидкости, происходящего либо при увеличении скорости ее перемещения (гидродинамическая кавитация), либо при прохождении звуковой волны большой интенсивности (акустическая кавитация). При длительных пикосекунды схлопывании мельчайших кавитационных пузырьков, заполненных паром самой жидкости, возникают гидравлические удары, сопровождаемые шумами, выделением тепла и разрушающие целостность молекул ДНК, находящихся в таком растворе.

Наиболее часто для фрагментации молекул ДНК используется энергия ультразвуковых волн. При этом, возможно, также стоит кратко остановиться на основных характеристиках звука. Принято считать, что человек слышит звуки в диапазоне от 16 герц до 16 и даже 20 килогерц. Ниже 16 герц будет инфразвук, выше 20 килогерц до 1 гигагерца – ультразвук, свыше 1 гигагерца – гиперзвук. При этом также надо вспомнить длины волн для некоторых частот. Так, ультразвук с частотой 20 килогерц имеет длину волны в водной среде около 7,3 см, ультразвук в 0,5 мегагерц и 1 мГц - всего 3 мм и 1,5 мм соответственно. Почему мы акцентируем внимание именно на этих значениях - станет ясно из дальнейшего изложения.

Впервые осознанно ультразвук для фрагментации ДНК был использован в 1958 г. [Doty et al., 1958] и в этой статье для разрушенного ультразвуком препарата ДНК был даже предложен термин – «соникат». Однако еще раньше другой группой авторов [Laland et al., 1951] было замечено, что при использовании ультразвука для выделения ДНК из бактерий вязкость раствора ДНК снижается, но истинного объяснения причин этого явления они тогда дать не смогли. За прошедший с того времени период проведена масса различных исследований, посвященных вопросу фрагментации ДНК под действием ультразвуковых волн, и опубликовано множество экспериментальных и обзорных статей на эту тему [Freifelder, Davison, 1962; Hawley et al., 1963; Richards, Boyer, 1965; Pritchard et al., 1966; Peacocke, Pritchard, 1968; Coakley, Dunn, 1971; Шугалий, Фонарев, 1975; Davis, Phillips, 1978; Hall et al., 1981; Fukudome et al., 1986; 1986a; 1987;

Elsner, Lindblad, 1989; Miller et al., 1995; Гроховский, 2006; Гроховский и др., 2008; Rageh et al., 2009; Grokhovsky et al., 2011; Ali et al., 2014 и др.].

С началом эры секвенирования ДНК протяженных фрагментов и полных геномов, а также развития ДНК-чиповых технологий на способ фрагментации молекул ДНК с помощью ультразвука обратили особое внимание как на простой и дешевый и при этом обеспечивающий адекватные воспроизводимые результаты [Deininger, 1983; Bankier et al., 1987; Burland et al., 1993; Mann, Krull, 2004; Sambrook, Russell, 2006; Larginho et al., 2010; Wang, Son, 2013; Xu et al., 2013 и др.].

В большинстве цитированных выше работ в качестве источников ультразвуковых волн использовались приборы, давно снятые с производства, а также производства некоторых фирм, вообще прекративших свое существование. Поэтому мы сознательно не упоминали используемые в тех статьях модели ультразвуковых дезинтеграторов, тем более, что это было не специализированное оборудование для фрагментации ДНК, а приспособленное. Другое дело сейчас - с развитием различных методов полногеномного секвенирования задача фрагментации ДНК случайным образом встала гораздо острее, в связи с чем, по крайней мере, четыре фирмы среди своего прочего ультразвукового оборудования стали производить специализированные устройства для фрагментации именно ДНК, отличающиеся по своим характеристикам.

Фирма Diagenode, Inc. производит прибор Bioruptor, представляющий из себя комплекс в виде ультразвуковой ванны, моторизованной крышки с держателями пробирок на разные объемы, управляющего блока и звукоизолирующего бокса. Частота используемых для фрагментации ультразвуковых волн составляет 20-60 кГц. Одновременно может «озвучиваться» до 12 образцов в закрытых пробирках объемах 0,5/0,65 мл. Время обработки в зависимости от желаемого размера фрагментов может составлять до получаса и более.

Фирма Qsonica недавно выпустила на рынок новую модель Q800R DNA Shearing Sonicator, рассчитанную на одновременную фрагментацию ультразвуком с частотой 20 кГц до 24 образцов объемом до 300 мкл в закрытом режиме, исключая перекрестную контаминацию. В зависимости от стоящих перед экспериментатором задач время обработки может варьировать от нескольких минут до получаса.

Немецкая фирма Hielscher производит несколько моделей ДНК-соникаторов - VCX 130 PB, UP100H, VialTweeter и др. с рабочей частотой ультразвуковых волн 20-24 кГц. Отличительной особенностью большинства этих приборов является выносной ультразвуковой зонд, погружаемый в раствор ДНК, которую необходимо фрагментировать, что снижает мощность, которую необходимо подавать, и сокращает время обработки. Зонд выполнен из нержавеющей стали, что несколько упрощает его деконтаминацию. При этом есть варианты обработки, при которой зонд прикладывается к стенкам пробирок снаружи и передает излучение путем вибрации, что исключает контаминацию.

Некоторым особняком стоят приборы американской фирмы Covaris Inc., которая производит целую линейку разных по производительности ДНК-соникаторов (M220-, S220-, E220-, LE220 Focused Ultrasonicators). Их общей отличительной чертой является частота используемых ультразвуковых волн от 500 кГц до 1 МГц высокой интенсивности. Это позволяет говорить о направленном действии акустических волн, поскольку малые длины волн такой частоты (1,5 - 3 мм против 7 см в моделях других фирм) дают возможность их точно фокусировать, тогда как, согласно первому закону термодинамики, нефокусированная акустическая энергия быстро рассеивается в виде тепла. Другой особенностью применяемой фирмой Covaris технологии можно считать особые пробирки microTUBE-15, специально сконструированные для лучшей фрагментации ДНК в закрытом виде и снабженные двумерным штрих-кодом, что позволяет отслеживать каждый образец индивидуально.

Как уже отмечалось, гидродинамическая кавитация возникает при локальных перепадах давления в жидкости, вызванных изменениями скорости ее движения. И хотя в статьях, которые мы собираемся здесь процитировать, об этом не упоминается, но наблюдаемое разрушение молекул ДНК было вызвано именно гидродинамическими ударами, вызванными схлопыванием кавитационных пузырьков. Так, быстрое перемешивание растворов ДНК, в том числе металлическими лопастями (или ножами) вызывало кавитацию, которая в свою очередь вызывала разрывы фосфодиэфирных связей в цепях ДНК. При этом скорости вращения таких механических тел в растворах ДНК в этих работах [Hershey et al., 1962; Dancis, 1978, Wittelsberger, Hansen, 1980] достигали, например, при использовании гомогенизатора

VirTis 45 весьма высоких значений в 45 тыс. об./мин, что несомненно приводило к кавитации.

Отдельное внимание стоит уделить способу фрагментации ДНК, где был использован вискозиметр двойного лучепреломления в потоке [Adam, Zimm, 1977]. Раствор ДНК в этом случае представлял собой тонкую пленку воды в 0,25 мм между двумя цилиндрами – стационарным внешним и вращающимся со скоростью до 22 об./сек внутренним. Видимо, в этом случае, помимо кавитации, еще и силы трения способствовали разрушению молекул ДНК.

Также гидродинамический удар возникает вследствие процесса небулизации (от лат. *nebula* — туман, облако), превращающего раствор ДНК в некое подобие тумана [Lentz et al., 2005]. При этом отмечается, что сами молекулы ДНК в месте своего нахождения служат затравочными агентами для нуклеации кавитационных явлений [Lentz et al., 2006]. При подаче инертного газа в некое устройство давление в нем стремительно растет и раствор ДНК попадает в узкий канал такого устройства, что сопровождается резким увеличением скорости движения жидкости и, выходя через форсунку во внутреннее пространство, раствор ДНК превращается в аэрозоль. Небулизация давно использовалась в медицинских целях для ингаляции различных лекарств с помощью специальных небулайзеров, которые бывают нескольких типов, включая компрессионные и ультразвуковые. В начале 1990-х гг. компрессионный медицинский небулайзер американской фирмы IPI Medical Products был адаптирован для фрагментации ДНК, для чего над ним были произведены некоторые усовершенствования в виде удаления безопасной бритвой ободка и перевертывания внутренней воронки, как описано в статьях разных авторов [Bodenteich et al., 1994; Andersson et al., 1996], причем в первой работе приведена схема действий и говорится, что сделать так им посоветовал Dr. S.Surzycki, впервые доложивший об этом способе на конференции в Сан-Диего [Surzycki, 1990]. Хотя, справедливости ради, следует заметить, что разрушение ДНК превращением содержащего ее раствора в аэрозоль было осуществлено еще в конце 50-х гг. [Cavalieri, Rosenberg, 1958]. Эти авторы в своей работе вместо небулайзера применяли стандартный стеклянный распылитель, используемый в виде насадки на подходящую колбу для опрыскивания бумажных или тонкослойных хроматограмм для проявления анализируемых пятен.

С середины 90-х гг. прошлого века фрагментация ДНК с помощью небулизации,

способствовавшая значительному уменьшению стартового количества материала и объема растворов, приобрела популярность ввиду простоты (не требуется специального оборудования), быстроты (несколько минут) и дешевизны (одноразовые пластиковые конструкции) всего процесса [Surzycki, 2003; Sambrook, Russell, 2006]. К недостаткам этого подхода можно отнести довольно большие потери ДНК при фрагментации во время образования ДНК-тумана. В настоящее время нет необходимости адаптировать медицинские небулайзеры, поскольку несколько фирм производят специальные конструкции для быстрой фрагментации ДНК, делающей ее пригодной для полногеномного секвенирования. Так, фирма Invitrogen, входящая в концерн Life Technologies, производит специальный небулайзер, фрагментирующий ДНК при давлении 9-10 psi за 1,5 – 2 мин. Другая американская фирма Bioo Scientific Corp. выпускает специальный набор AIR™ DNA Fragmentation Kit с помощью которого за 6 мин при давлении 50 psi ДНК превращается во фрагменты длиной от 150 до 800 п.н. В соответствующих буклетах этих фирм можно ознакомиться с устройством их небулайзеров, а также получить другую дополнительную информацию о фрагментации ДНК для полногеномного секвенирования.

Впервые о способе фрагментации ДНК путем продавливания ее раствора через тонкую иглу шприца и возникающих гидродинамических воздействий упоминается еще в 1962 г. [Freifelder, Davison, 1962]. Тогда этими авторами был использован шприц с иглой для подкожных инъекций gauge #27 с диаметром отверстия 0,21 мм. Учитывая важность такого простого гидродинамического воздействия на молекулы ДНК и его распространенности, была даже опубликована целая серия работ, посвященная вопросам компьютерной симуляции данного процесса [Iyengar, Quave, 1979; 1979a; Iyengar, 1980].

С целью автоматизации процесса в дальнейшем было предложено несколько устройств, в которых раствор ДНК под давлением многократно пропускаться через тонкое отверстие, по сути, заменяя ручное обращение со шприцом [Oefner et al., 1996; Thorstenson et al., 1998]. Конструкция из последней работы легла в основу двух моделей приборов HydroShear и HydroShear Plus, производимых американской фирмой Digilab, Inc. Данные гидрорезницы способны за короткое время (порядка 10 мин) «нарезать» ДНК на фрагменты нужного экспериментатору размера, для чего в приборы устанавливаются сменные пропускные отверстия разного диаметра (от 0,0016 до 0.005

дюймов). Минимальный объем, с которым позволяет работать, составляет всего 40 мкл (максимальный – 500 мкл) и потери образца сведены к минимуму.

Если в описанных конструкциях, включая обычные шприцы, разрушающим ДНК было одно отверстие, через которое пропускался раствор, то в другой работе фрагментация ДНК осуществлялась путем продавливания раствора через одноразовый фильтр из нержавеющей стали со множеством отверстий микронных и субмикронных размеров, что заметно ускорило процесс получения фрагментов ДНК [Jones, Huang, 2009].

Учитывая тенденцию к миниатюризации лабораторного оборудования и уменьшения количества анализируемых молекул, для фрагментации ДНК были предложены и микрофлюидные устройства, где в зависимости от желаемых размеров фрагментов ДНК использовались короткие или длинные перетяжки малого диаметра, в которых происходило резкое изменение скорости тока жидкости и именно в этом месте фрагментировалась ДНК; либо в целом менялось подаваемое давление. Было показана пригодность этих устройств для генерации исходных матриц для полногеномного секвенирования [Shui et al., 2011; Nesterova et al., 2012]. Комбинация микрофлюидного устройства и ультразвукового воздействия, производимого с помощью встроенных излучателей, успешно примененных для фрагментации ДНК, описаны в статьях других авторов [Tseng et al., 2012; Okabe, Lee, 2014], причем в первой из этих работ фрагментация ДНК осуществлялась в субмикролитровых объемах при частоте 63 кГц, а во второй использовалась чуть меньшая частота 49,3 кГц.

Помимо устройств, рассчитанных на протекание раствора ДНК через отверстия для фрагментации ДНК, использовались и иные принципы. Так, было показано, что перепад давления, возникающий в устройстве, применяемом для разрушения под давлением бактериальных клеток и известном как Френч-пресс, также пригоден для фрагментации ДНК [Davidson et al., 1973; Ordahl et al., 1976; Schriefer et al., 1990], причем в разных работах получаемые этим способом фрагменты ДНК имели средние размеры в 230, 450 п.н., а также колебались в диапазоне от 4 до 6 т.п.н.

В литературе также встречается упоминание использования микроволнового излучения для фрагментации ДНК, пригодной затем для полногеномного секвенирования новых поколений [Yang, Hang, 2013]. Авторы для разрушения ДНК в

течение 5 – 60 мин использовали магнетрон мощностью 150 Вт и осуществляли контроль температуры, чтобы она не превышала 95°C, параллельно для сравнения ведя исключительно тепловую фрагментацию ДНК в термоциклере при тех же 95°C. По их данным воздействие микроволнами оказалось довольно эффективным и не привело к модификациям азотистых оснований. Некоторым недостатком может быть одноцепочечность получаемых фрагментов ДНК, что накладывает определенные ограничения на последующее обращение с такими фрагментами ДНК.

В одной из работ для фрагментации ДНК использовали многократное автоклавирувание [Zwick et al., 1997]. Раствор ДНК в объеме 1 мл помещался в 1,5 мл. пробирки, которые неплотно закрывались для того, чтобы давление в них также росло. После трех 5-ти минутных циклов осуществлялся контроль степени фрагментации с помощью гель-электрофореза. Если требовались дополнительные циклы автоклавирувания, то они проводились до тех пор пока фрагменты ДНК преимущественно не принимали размер от 100 до 1000 нуклеотидов. В этом случае в результате автоклавирувания ДНК также становилась одноцепочечной, но поскольку в данной работе далее с помощью кинетики реассоциации велся отбор определенных фракций ДНК, то это не служило каким-либо препятствием.

Еще одним физическим воздействием, приводящим к возникновению двухцепочечных разрывов в ДНК, является радиация [Freifelder, Davison, 1962]. Другими авторами было показано, что обработка молекул ДНК довольно высокими дозами рентгеновского излучения приводила к появлению фрагментов ДНК, размер которых оказался весьма крупным и подходящим для разделения пульс-гель-электрофорезом [Game et al., 1990]. Еще ряд работ был посвящен как экспериментальным, так и теоретическим вопросам разрушения молекул ДНК под действием радиации с образованием фрагментов размеров от 100 млн.п.н. до 2 т.п.н. с высказыванием предположений об использовании таких подходов на практике [Cook, Mortimer, 1991; Ропомарев et al., 2000; 2001]. Теоретически, если увеличить дозу, продлить экспозицию, то, наверное, можно дождаться и появления фрагментов ДНК с размерами, удовлетворяющими условиям полногеномного секвенирования с использованием подходов массивного параллелизма, однако ввиду радиационной опасности и ограниченной доступности такого способа большинству экспериментаторов, он не может носить массовый

характер и быть рекомендован научному сообществу молекулярных биологов.

Весьма перспективной выглядит химическая фрагментация ДНК, происходящая случайным образом под действием комплексных соединений, генерирующих гидроксильные радикалы, таких как, например, Fe-ЭДТА, ввиду дешевизны и отсутствия в необходимости какого-либо специального оборудования. Так, уже описан способ подготовки библиотеки для массивного параллельного секвенирования после химической фрагментации ДНК данным соединением [Guarnati et al., 2013].

Довольно оригинальным и также перспективным подходом можно считать так называемую ПЦР-фрагментацию ДНК, предложенную отечественными авторами [Zheleznaia et al., 1999]. Одним из преимуществ данного подхода является то, что экспериментатор может обходиться крайне малым стартовым количеством ДНК, поскольку одновременно с фрагментацией идет и амплификация всей ДНК. Авторы отметили, что идея такой фрагментации лежит в широко использовавшемся способе (радиоактивного) мечения ДНК с помощью случайного гекса- и нонануклеотидного праймирования. К недостаткам такого подхода следует отнести некоторую избирательность самого процесса амплификации, хотя и в самих методах секвенирования ДНК на основе массивного параллелизма этап амплификации неизбежен. В цитируемой работе была использована двухстадийная ПЦР, в которой сначала в первых двух циклах удлинение 3'-концов праймеров, несущих по девять звеньев случайной последовательности, велось при 16°C с помощью повторно добавляемого фермента - Кленовского фрагмента ДНК полимеразы I. Затем в реакцию добавляли новую порцию уже константных праймеров, отжигающихся на 5'-участках этих составных праймеров из первой стадии, и Taq полимеразу. Несколько ранее схожую работу выполнили американские авторы, которые таким образом с несколько иной целью, но фрагментировали ДНК дрожжей [Grothues et al., 1993]. Можно заметить, что, скорее всего, подобную ПЦР-фрагментацию можно проводить с использованием только термостабильной ДНК полимеразы, поскольку уже довольно давно был предложен способ успешной амплификации ДНК со случайными очень короткими праймерами, успешно удлиняющимися таким ферментом [Caetano-Anollés et al., 1991].

Фрагментация молекул ДНК под действием ферментов

Известным много лет ферментом, разрушающим ДНК, является неспецифическая ДНКаза I, расщепляющая цепи ДНК в произвольных местах, что было использовано для фрагментации ДНК в качестве альтернативы ультразвуковому разрушению еще в начале 60-х гг. [Freifelder, Davison, 1962]. Хотя есть сообщения, что ДНКаза I предпочтительно расщепляет последовательности - АТΥАТ[▼]АТΥ и наоборот, весьма редко выбирает участки с такими нуклеотидами - GСRR[▼]ТТΥ [Herrera, Chaires, 1994]. Тем не менее, ДНКаза I используется для фрагментации ДНК для целей секвенирования довольно часто и в литературе имеются методические статьи, где рассмотрены различные аспекты такого разрушения [Anderson, 1991].

Итальянскими авторами предложен интересный вариант разрушения молекул ДНК с помощью ДНКазы I в местах, отстоящих друг от друга на некоем фиксированном расстоянии [Azzoni et al., 2007], определяемом формируемой in vitro нуклеосомной организацией ДНК, благодаря добавленному в реакционную смесь очищенному рекомбинантному гистоновому белку из археобактерии *Methanothermus fervidus*. Так как на гистоны археобактерии «накручивается» цепь ДНК это делает ее защищенной от действия ДНКазы, и варьируя соотношение ДНК/гистон и время обработки, авторы добились того, что происходило расщепление через 60, 120, 180 и т.д. п.н., как хорошо видно из электрофоретической картины разделения фрагментов ДНК в 2%-ном агарозном геле в цитируемой статье.

Для фрагментации ДНК для целей секвенирования можно использовать и частощепляющие рестрикционные эндонуклеазы, например, с тетра-нуклеотидным сайтом узнавания. Однако, несмотря на то, что в условной ДНК частота встречаемости таких последовательностей теоретически составляет один сайт на 256 п.н. (4⁴), она в реальности очень сильно зависит от GC-состава анализируемой геномной ДНК и сайта узнавания используемого фермента, что в итоге делает тетра-нуклеотидные рестриктазы мало пригодными для этой цели. После обнаружения такой рестрикционной эндонуклеазы как CviII, узнающей и расщепляющей с образованием тупых концов последовательность PuG[▼]CPu [Xia et al., 1987], ситуация с возможностью случайного расщепления и образования набора

перекрывающихся фрагментов ДНК с использованием подхода недорестрикции коренным образом поменялась. Этот фермент довольно активно используется при приготовлении матриц для секвенирования [Fitzgerald et al., 1992; Swaminathan et al., 1994; Gingrich et al., 1996]. Также показано, что при проведении реакции в нетипичных условиях данный фермент способен проявлять так называемую «звездную» активность, что позволяет ему расщеплять и иные сайты - PuG[▼]CPu, PyG[▼]CPy, но не PyG[▼]CPu [Fitzgerald et al., 1992; Swaminathan et al., 1994], в целом способствуя более случайному характеру фрагментации ДНК. Однако для секвенирования геномов микроорганизмов с низким GC-составом рестриктаза CviII пригодна в меньшей степени, ввиду не столь равномерного покрытия всей геномной последовательности.

Неспецифическое расщепление цепей ДНК или лишь с небольшим предпочтением демонстрируют такие ферменты как эндонуклеаза CoIE7 и периплазматическая нуклеаза Vvn [Wang et al., 2007]. CoIE7 является токсичным белком кишечной палочки *E.coli*, несущим эндонуклеазный домен, а Vvn эндонуклеаза выделена из бактерии *Vibrio vulnificus*, где она выполняет роль защитного фермента, разрушающего чужеродную ДНК, попадающую в периплазматическое пространство. Данные ферменты составили основу ферментного комплекса NEBNext dsDNA Fragmentase, поставляемого фирмой New England Biolabs, Inc. для фрагментации ДНК при составлении библиотек для полногеномного секвенирования новых поколений с помощью разных платформ [de Sousa Dias et al., 2013; Clarke et al., 2014]. Процесс фрагментации ДНК с помощью dsDNA Fragmentase является время-зависимым и соответственно продолжительности реакции обеспечивает выход фрагментов ДНК размером 100-800 п.н. При этом в литературе есть упоминания, что данные модифицированные и слитые с белком, связывающим мальтозу, рекомбинантные ферменты при фрагментации ДНК чаще, чем физические методы разрушения приводят к возникновению нежелательных инсерций и делеций [Head et al., 2014]. Однако ранее другими авторами отмечается, что при сравнении трех методов фрагментации ДНК (небулизация, ультразвуковое воздействие с помощью прибора Bioruptor и ферментативное расщепление с использованием dsDNA Fragmentase) пиросеквенирование на платформе 454 дало сходные результаты [Knierim et al., 2011].

Весьма производительной среди ферментных методов фрагментации ДНК для целей полногеномного секвенирования стоит

² Символ ▼ здесь и далее означает место расщепления цепи ДНК.

считать обработку Tn5 транспозазой, входящей в набор Nextera DNA Sample Prep Kit, поставляемый фирмой Epicentre Biotechnologies. К важным особенностям данного процесса следует отнести происходящие в одной пробирке последовательно этапы случайной фрагментации ДНК, пришивания адапторов, завершаемых всего за два часа, что используется уже во множестве работ [Adey et al., 2010; Caruccio, 2011; Marine et al., 2011; Lambie et al., 2013; Picelli et al., 2014 и др.]. При этом стартовое количество ДНК может быть гораздо меньшим, чем при использовании физических методов фрагментации ДНК. Так, было показано, что всего 20 пг ДНК мыши (около семи гаплоидных геномов) оказалось достаточно для приготовления библиотеки для ресеквенирования с 0,4-х кратным покрытием картированных фрагментов [Parkinson et al., 2012].

Аналогичными возможностями и сходной производительной характеризуется производимый фирмой Thermo Scientific набор MuSeek Library Preparation Kit, основу которого составляет MuA транспозаза, также формирующая с фрагментируемой ДНК транспозосомный комплекс [Naara et al., 1999; 1999a; Butterfield et al., 2002], успешно применяемый и для полногеномного секвенирования [Brady et al., 2011].

Заключение

Таким образом, как следует из данного обзора литературы, способов фрагментации молекул ДНК достаточно много. И хотя в настоящее время преобладают методы, основанные на физических воздействиях, некоторый оптимизм внушают и способы химической фрагментации ДНК. При этом ряд ферментативных методов имеют важное преимущество в виде возможности работать с ограниченным стартовым количеством ДНК. Фрагментация ДНК путем амплификации с помощью ПЦР случайных участков этой молекулы также позволяет обходиться крайне малым количеством ДНК.

Приготовление максимально равномерно покрывающей весь секвенируемый геном какого-либо организма библиотеки лежит в основе методов полногеномного секвенирования, основанных на массивном параллелизме, однако, в будущем полногеномное секвенирование неизбежно станет мономолекулярным, причем специальная фрагментация секвенируемых молекул потребоваться не будет, поскольку будет достаточно той, которая происходит при обычном выделении ДНК и последующим обращении с этой чрезвычайно длинной молекулой. В своих недавних статьях-прогнозах [Чемерис и др., 2013; 2013a] мы

рассмотрели перспективы новых подходов к секвенированию полных геномов и уделили этим вопросам значительное внимание.

Благодарности

Интерес к данной тематике вызван проводимыми нами исследованиями по гранту РФФИ-Поволжье №14-04-97048-р_поволжье_а.

Литература

1. Гроховский С.Л. Специфичность расщепления ДНК ультразвуком .. Молекулярная биология. 2006. Т.40. С.317-325.
2. Гроховский С.Л., Ильичева И.А., Нечипуренко Д.Ю., Панченко Л.А., Полозов Р.В., Нечипуренко Ю.Д. Локальные неоднородности структуры и динамики двуспиральной ДНК: Исследование при помощи ультразвука // Биофизика. 2008. Т.53. С.417-425.
3. Чемерис А.В., Магданов Э.Г., Гарафутдинов Р.Р., Матниязов Р.Т., Баймиев А.Х., Бикбулатова С.М., Гималов Ф.Р., Вахитов В.А. Некоторое технологическое прошлое, настоящее, а также будущее современной биологии к 2030 году (часть первая) // Биомика, 2013, Т.5, С.10-43.
4. Чемерис А.В., Магданов Э.Г., Гарафутдинов Р.Р., Матниязов Р.Т., Баймиев А.Х., Бикбулатова С.М., Гималов Ф.Р., Вахитов В.А. Некоторое технологическое прошлое, настоящее, а также будущее современной биологии к 2030 году (часть вторая) // Биомика, 2013, Т.5. С. 75-125.
5. Шугалий А.В., Фонарев А.Б. Об использовании ультразвуковой деградации ДНК при изучении кинетики реассоциации // Биохимия. 1975. Т.40. С.598-604.
6. Adam R.E., Zimm B.H. Shear degradation of DNA // Nucleic Acids Res. 1977. V.4. P.1513-1537.
7. Adey A., Morrison H.G., Asan, Xun X., Kitzman J.O., Turner E.H., Stackhouse B., MacKenzie A.P., Caruccio N.C., Zhang X., Shendure J. Rapid, low-input, low-bias construction of shotgun fragment libraries by high-density in vitro transposition // Genome Biol. 2010. V.11. R119.
8. Ali M.H., Al-Saad K.A., Ali C.M. Biophysical studies of the effect of high power ultrasound on the DNA solution // Phys. Med. 2014. V.30. P.221-227.
9. Anderson S. Shotgun DNA sequencing using cloned DNA I-generated fragments // Nucl/ Acids Res. 1981. V.9. P.3015-3027.
10. Andersson B., Wentland M.A., Ricafrente J.Y., Liu W., Gibbs R.A. A "double adaptor" method for improved shotgun library construction // Anal. Biochem. 1996. V.236. P.107-113.
11. Azzoni E., Sblattero D., Licciulli M., Marzari R., Edomi P. Using archaeal histones for precise DNA

- fragmentation // *Protein Eng. Des. Sel.* 2007. V.20. P.267-271.
12. Bankier A.T., Weston K.M., Barrell B.G. Random cloning and sequencing by the M13/dideoxynucleotide chain termination method // *Methods Enzymol.* 1987. V.155. P.51-93.
 13. Bertazzoni U. Analysis of the breaking sites in the physical degradation of DNA // *Biochim. Biophys. Acta.* 1975. V.395. P.239-245.
 14. Bodenteich A., Chisoe S., Wang Y-F., Roe B.A. Shotgun cloning as the strategy of choice to generate templates for high-throughput dideoxynucleotide sequencing / in: *Automated DNA sequencing and analysis* (eds. Adams M.D., Fields C., Venter J.C.) San Diego. 1994. P.42-50.
 15. Brady T., Roth S.L., Malani N., Wang G.P., Berry C.C., Leboulch P., Hacin-Bey-Abina S., Cavazzana-Calvo M., Papapetrou E.P., Sadelain M., Savilahti H., Bushman F.D. A method to sequence and quantify DNA integration for monitoring outcome in gene therapy // *Nucleic Acids Res.* 2011. V.39. e72
 16. Burland V., Daniels D.L., Plunkett G. 3rd, Blattner F.R. Genome sequencing on both strands: the Janus strategy // *Nucleic Acids Res.* 1993. V.21. P.3385-3390.
 17. Butterfield Y.S., Marra M.A., Asano J.K., Chan S.Y., Guin R., Krzywinski M.I., Lee S.S., MacDonald K.W., Mathewson C.A., Olson T.E., Pandoh P.K., Prabhu A.L., Schnerch A., Skalska U., Smailus D.E., Stott J.M., Tsai M.I., Yang G.S., Zuyderduyn S.D., Schein J.E., Jones S.J. An efficient strategy for large-scale high-throughput transposon-mediated sequencing of cDNA clones // *Nucleic Acids Res.* 2002. V.30. P.2460-2468.
 18. Caetano-Anollés G., Bassam B.J., Gresshoff P.M. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers // *Biotechnology (N Y).* 1991. V.9. P.553-557.
 19. Caruccio N. Preparation of next-generation sequencing libraries using Nextera™ technology: simultaneous DNA fragmentation and adaptor tagging by in vitro transposition // *Methods Mol. Biol.* 2011. V.733. P.241-255.
 20. Cavalieri L.F., Rosenberg B.H. Shear Degradation of Deoxyribonucleic Acid // *J. Amer. Chem. Soc.* 1959. V.81. P.5136-5139.
 21. Clarke A.C., Prost S., Stanton J.A., White W.T., Kaplan M.E., Matisoo-Smith E.A.; Genographic Consortium. From cheek swabs to consensus sequences: an A to Z protocol for high-throughput DNA sequencing of complete human mitochondrial genomes // *BMC Genomics.* 2014. V.15. 68.
 22. Cook V.E., Mortimer R.K. A quantitative model of DNA fragments generated by ionizing radiation, and possible experimental applications // *Radiat. Res.* 1991. V.125. P.102-106.
 23. Dancis B.M. Shear breakage of DNA // *Biophys. J.* 1978. V.24. P.489-503.
 24. Davidson E.H., Hough B.R., Amenson C.S., Britten R.J. General interspersion of repetitive with non-repetitive sequence elements in the DNA of *Xenopus* // *J. Mol. Biol.* 1973. V.77. P.1-23.
 25. Davis A.W., Phillips D.R. A defined molecular-weight distribution of deoxyribonucleic acid after extensive sonication // *Biochem. J.* 1978. V.173. P.179-183.
 26. Deininger P.L. Random subcloning of sonicated DNA: application to shotgun DNA sequence analysis // *Anal. Biochem.* 1983. V.129. P.216-223.
 27. de Sousa Dias M., Hernan I., Pascual B., Borrás E., Mañé B., Gamundi M.J., Carballo M. Detection of novel mutations that cause autosomal dominant retinitis pigmentosa in candidate genes by long-range PCR amplification and next-generation sequencing // *Mol. Vis.* 2013. V.19. P.654-664
 28. Doty P., McGill B.B., Rice S.A. The properties of sonic fragments of deoxyribose nucleic acid // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1958. V.44. P.432-438.
 29. Elsner H.I., Lindblad E.B. Ultrasonic degradation of DNA // *DNA.* 1989. V.8. P.697-701.
 30. Fitzgerald M.C., Skowron P., Van Etten J.L., Smith L.M., Mead D.A. Rapid shotgun cloning utilizing the two base recognition endonuclease CviJI // *Nucleic Acids Res.* 1992. V.20. P.3753-3762
 31. Freifelder D., Davison P.F. Studies on the sonic degradation of deoxyribonucleic acid // *Biophys. J.* 1962. V.2. P.235-247.
 32. Fukudome K., Yamaoka K., Nishikori K., Takahashi T., Yamamoto O. Ultrasonic scission of deoxyribonucleic acid in aqueous solution I. Conditions for sonication and molecular weights of sonicated samples // *Polymer J.* 1986. V.18. P.71-79.
 33. Fukudome K., Yamaoka K., Nishikori K., Takahashi T., Yamamoto O. Ultrasonic scission of deoxyribonucleic acid in aqueous solution II. Precipitatorial fractionation and molecular weights of sonicated samples // *Polymer J.* 1986. V.18. P.81-88.
 34. Fukudome K., Yamaoka K., Ochiai H. Ultrasonic Scission of Deoxyribonucleic Acid in Aqueous Solution III. The Solution Properties of Sonicated Low Molecular Weight Samples as Revealed by Light Scattering and Viscosity // *Polymer J.* 1987. V.19. P.1385 – 1394.
 35. Game J.C., Bell M., King J.S., Mortimer R.K. Random-breakage mapping, a rapid method for physically locating an internal sequence with respect to the ends of a DNA molecule // *Nucleic Acids Res.* 1990. V.18. P.4453-4461.

36. Gyarmati P., Song Y., Hällman J., Käller M. Chemical fragmentation for massively parallel sequencing library preparation // *J. Biotechnol.* 2013. V.168. P.95-100.
37. Gingrich J.C., Boehrer D.M., Basu S.B. Partial CviJI digestion as an alternative approach to generate cosmid sublibraries for large-scale sequencing projects // *Biotechniques.* 1996. V.21. P.99-104.
38. Grokhovsky S.L., Il'icheva I.A., Nechipurenko D.Y., Golovkin M.V., Panchenko L.A., Polozov R.V., Nechipurenko Y.D. Sequence-specific ultrasonic cleavage of DNA // *Biophys. J.* 2011. V.100. P.117-125.
39. Grothues D., Cantor C.R., Smith C.L. PCR amplification of megabase DNA with tagged random primers (T-PCR) // *Nucleic Acids Res.* 1993. V.21. P.1321-1322.
40. Hagerman P.J. Flexibility of DNA // *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 1988. V.17. P.265-286.
41. Hall A.B., Christie J.R., Phillips D.R. A thermodynamic view of polymer degradation, and its application to extensive sonication of DNA // *Biophys. Chem.* 1981. V.13. P.275-281.
42. Haapa S., Suomalainen S., Erikäinen S., Airaksinen M., Paulin L., Savilahti H. An efficient DNA sequencing strategy based on the bacteriophage *mu* in vitro DNA transposition reaction // *Genome Res.* 1999. V.9. P.308-315.
43. Haapa S., Taira S., Heikkinen E., Savilahti H. An efficient and accurate integration of mini-Mu transposons in vitro: a general methodology for functional genetic analysis and molecular biology applications // *Nucleic Acids Res.* 1999. V.27. P.2777-2784.
44. Hawley S.A., Macleod R.M., Dunn F. Degradation of DNA by intense, noncavitating ultrasound // *J. Acoust. Soc. Amer.* 1963. V.35. P.1285-1287.
45. Head S.R., Komori H.K., LaMere S.A., Whisenant T., Van Nieuwerburgh F., Salomon D.R., Ordoukhanian P. Library construction for next-generation sequencing: overviews and challenges // *Biotechniques.* 2014. V.56. P.61-4, 66, 68, passim.
46. Herrera J.E., Chaires J.B. Characterization of preferred deoxyribonuclease I cleavage sites // *J. Mol. Biol.* 1994. V.236. P.405-411.
47. Hershey A.D., Burgi E., Ingraham L. Sedimentation coefficient and fragility under hydrodynamic shear as measures of molecular weight of the DNA of phage T5 // *Biophys. J.* 1962. V.2. P.423-431.
48. Joneja A., Huang X. A device for automated hydrodynamic shearing of genomic DNA // *Biotechniques.* 2009. V.46. P.553-556.
49. Il'icheva I.A., Nechipurenko D.Y., Grokhovsky S.L. Ultrasonic cleavage of nicked DNA // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2009. V.27. P.391-398.
50. Iyengar S.S. A computer model for hydrodynamic shearing of DNA-further investigation on distribution of break lengths: Part III // *Comput. Programs Biomed.* 1980. V.12. P.183-190.
51. Iyengar S.S., Quave S.A. A computer model for hydrodynamic shearing of DNA (Gibb's phenomenon): Part II // *Comput. Programs Biomed.* 1979. V.10. P.133-135.
52. Iyengar S.S., Quave S.A. A computer model for hydrodynamic shearing of DNA // *Comput. Programs Biomed.* 1979. V.9. P.160-168.
53. Knierim E., Lucke B., Schwarz J.M., Schuelke M., Seelow D. Systematic comparison of three methods for fragmentation of long-range PCR products for next generation sequencing // *PLoS One.* 2011. V.6. e28240.
54. Laland S.G., Overend W.G., Stacey M. Deoxypentose nucleic acids. Part III. Some effects of ultrasonic waves on deoxypentose nucleic acids // *J. Chem. Soc.* 1952. P. 303-310.
55. Lambie S., Batty E., Attar M., Buck D., Bowden R., Lunter G., Crook D., El-Fahmawi B., Piazza P. Improved workflows for high throughput library preparation using the transposome-based Nextera system // *BMC Biotechnol.* 2013. V.13. 104
56. Larginho M., Santos H.M., Doria G., Scholz H., Baptista P.V., Capelo J.L. Development of a fast and efficient ultrasonic-based strategy for DNA fragmentation // *Talanta.* 2010. V.81. P.881-886.
57. Lentz Y.K., Worden L.R., Anchordoquy T.J., Lengsfeld C.S. Effect of jet nebulization on DNA: identifying the dominant degradation mechanism and mitigation methods // *Journal of Aerosol Science.* 2005. V.36. P.973-990.
58. Lentz Y.K., Anchordoquy T.J., Lengsfeld C.S. DNA acts as a nucleation site for transient cavitation in the ultrasonic nebulizer // *J. Pharm. Sci.* 2006. V.95. P.607-619.
59. Mann T.L., Krull U.J. The application of ultrasound as a rapid method to provide DNA fragments suitable for detection by DNA biosensors // *Biosens. Bioelectron.* 2004. V.20. P.945-955.
60. Marine R., Polson S.W., Ravel J., Hatfull G., Russell D., Sullivan M., Syed F., Dumas M., Wommack K.E. Evaluation of a transposase protocol for rapid generation of shotgun high-throughput sequencing libraries from nanogram quantities of DNA // *Appl. Environ. Microbiol.* 2011. V.77. P.8071-8079.
61. Miller D.L., Thomas R.M., Buschbom R.L. Comet assay reveals DNA strand breaks induced by ultrasonic cavitation in vitro // *Ultrasound Med. Biol.* 1995. V.21. P.841-848.

62. Meyer H.H., Pfeiffer W.F., Ferry J.D. Dynamic viscoelastic properties of solutions of shear-degraded deoxyribonucleic acid // *Biopolymers*. 1967. V.5. P.123–130.
63. Nechipurenko Yu.D, Golovkin M.V., Nechipurenko D.Yu., Il'icheva I.A., Panchenko L.A., Polozov R.V., Grokhovskii S.L. Characteristics of ultrasonic cleavage of DNA // *J. Structural Chemistry*. 2009. V.50. P.1007-1013.
64. Nesterova I.V., Hupert M.L., Witek M.A., Soper S.A. Hydrodynamic shearing of DNA in a polymeric microfluidic device // *Lab Chip*. 2012. V.12. P.1044-1047.
65. Oefner P.J., Hunicke-Smith S.P., Chiang L., Dietrich F., Mulligan J., Davis R.W. Efficient random subcloning of DNA sheared in a recirculating point-sink flow system // *Nucleic Acids Res*. 1996. V.24. P.3879-3886.
66. Okabe Y., Lee A.P. LCAT DNA shearing // *J. Lab. Autom.* 2014. V.19. P.163-170.
67. Ordahl C.P., Johnson T.R., Caplan A.I. Sheared DNA fragment sizing: comparison of techniques // *Nucleic Acids Res*. 1976. V.3. P.2985-2999.
68. Parkinson N.J., Maslau S., Ferneyhough B., Zhang G., Gregory L., Buck D., Ragoussis J., Ponting C.P., Fischer M.D. Preparation of high-quality next-generation sequencing libraries from picogram quantities of target DNA // *Genome Res*. 2012. V.22. P.125-133.
69. Peacocke A.R., Pritchard N.J. The ultrasonic degradation of biological macromolecules under conditions of stable cavitation. II. Degradation of deoxyribonucleic acid // *Biopolymers*. 1968. V.6. P.605-623.
70. Picelli S., Björklund A.K., Reinius B., Sagasser S., Winberg G., Sandberg R. Tn5 transposase and tagmentation procedures for massively scaled sequencing projects // *Genome Res*. 2014. V.24. P.2033-2040
71. Ponomarev A.L., Brenner D., Hlatky L.R., Sachs R.K. A polymer, random walk model for the size-distribution of large DNA fragments after high linear energy transfer radiation // *Radiat. Environ. Biophys*. 2000. V.39. P.111-120.
72. Ponomarev A.L., Cucinotta F.A., Sachs R.K., Brenner D.J. Monte Carlo predictions of DNA fragment-size distributions for large sizes after HZE particle irradiation // *Phys. Med*. 2001. V.17 Suppl. 1. P.153-156.
73. Poptsova M.S., Il'icheva I.A., Nechipurenko D.Y., Panchenko L.A., Khodikov M.V., Oparina N.Y., Polozov R.V., Nechipurenko Y.D., Grokhovsky S.L. Non-random DNA fragmentation in next-generation sequencing // *Sci. Rep*. 2014. V.4. 4532.
74. Pritchard N.J., Hughes D.E., Peacocke A.R. The ultrasonic degradation of biological macromolecules under conditions of stable cavitation. I. Theory, methods, and application to deoxyribonucleic acid // *Biopolymers*. 1966. V.4. P.259–273.
75. Rafi A., Weiss J.J., Wheeler C.M. Effect of gamma-radiation on aqueous solutions of DNA's of different base composition // *Biochim. Biophys. Acta*. 1968. V.169. P.230-240.
76. Rageh M.M., El-Lakkani A., Ali M.H.M., Fattah A.A.-M.M., Rafaat A.E-G. Effect of high power ultrasound on aqueous solution of DNA // *International Journal of Physical Sciences*. 2009. V.4. P.63-68.
77. Richards O.C., Boyer P.D. Chemical mechanism of sonic, acid, alkaline and enzymic degradation of DNA // *J. Mol. Biol*. 1965. V.11. P.327–340.
78. Sambrook J., Russell D.W. Fragmentation of DNA by nebulization // *CSH Protoc*. 2006. 2006(4). pii: pdb.prot4539
79. Sambrook J., Russell D.W. Fragmentation of DNA by sonication // *CSH Protoc*. 2006. 2006(4). pii: pdb.prot4538.
80. Schriefer L.A., Gebauer B.K., Qui L.Q., Waterston R.H., Wilson R.K. Low pressure DNA shearing: a method for random DNA sequence analysis // *Nucleic Acids Res*. 1990. V.18. P.7455-7456.
81. Shui L., Bomer J.G., Jin M., Carlen E.T., van den Berg A. Microfluidic DNA fragmentation for on-chip genomic analysis // *Nanotechnology*. 2011. V.22. 494013.
82. Skowron P.M., Swaminathan N., McMaster K., George D., Van Etten J.L., Mead D.A. Cloning and applications of the two/three-base restriction endonuclease R.CviJI from IL-3A virus-infected *Chlorella* // *Gene*. 1995. V.157. P.37-41.
83. Surzycki S. A Fast Method to Prepare Random Fragment Sequencing Libraries using a New Procedure of DNA Shearing by Nebulization and Electroporation. 1990. In *The International Conference on the Status and Future of Research on the Human Genome. Human Genome II*. (San Diego, CA), pp. 51. (цит. по Surzycki, 2003].
84. Surzycki S. *Human molecular biology laboratory* / 2003. Blackwell Science Ltd. 229 P.
85. Swaminathan N., George D., McMaster K., Szablewski J., Van Etten J.L., Mead D.A. Restriction generated oligonucleotides utilizing the two base recognition endonuclease CviJI* // *Nucleic Acids Res*. 1994. V.22. P.1470-1475.
86. Thorstenson Y.R., Hunicke-Smith S.P., Oefner P.J., Davis R.W. An automated hydrodynamic process for controlled, unbiased DNA shearing // *Genome Res*. 1998. V.8. P.848-855.

87. Tseng Q., Lomonosov A.M., Furlong E.E., Merten C.A. Fragmentation of DNA in a sub-microliter microfluidic sonication device // *Lab Chip*. 2012. V.12. P.4677-4682.
88. Wang X., Son A. Effects of pretreatment on the denaturation and fragmentation of genomic DNA for DNA hybridization // *Environ. Sci. Process Impacts*. 2013. V.15. P.2204-2212.
89. Xia Y.N., Burbank D.E., Uher L., Rabussay D., Van Etten J.L. IL-3A virus infection of a *Chlorella*-like green alga induces a DNA restriction endonuclease with novel sequence specificity // *Nucleic Acids Res.* 1987. V.15. P.6075-6090.
90. Xu W., Shang Y., Zhu P., Zhai Z., He J., Huang K., Luo Y. Randomly broken fragment PCR with 5' end-directed adaptor for genome walking // *Scientific Reports* 2013. V.3. 3465.
91. Xu W., Shang Y., Zhu P., Zhai Z., He J., Huang K., Luo Y. Randomly broken fragment PCR with 5' end-directed adaptor for genome walking // *Scientific Reports* 2013. V.3. 3465.
92. Wang Y.T., Yang W.J., Li C.L., Doudeva L.G., Yuan H.S. Structural basis for sequence-dependent DNA cleavage by nonspecific endonucleases // *Nucleic Acids Res.* 2007. V.35. P.584-594.
93. Wittelsberger S.C., Hansen J.N. Hydroxyapatite chromatography of short single-stranded DNA // *Biochim. Biophys. Acta*. 1979. V.565. P.125-130.
94. Yang Y., Hang J. Fragmentation of genomic DNA using microwave irradiation // *J. Biomol. Tech.* 2013. V.24. P.98-103.
95. Zheleznaya L.A., Kossykh V.G., Svad'bina I.V., Oshman T.S., Matvienko N.I. PCR fragmentation of DNA // *Biochemistry (Mosc)*. 1999. V.64. P.373-378.
96. Zwick M.S., Hanson R.E., Islam-Faridi M.N., Stelly D.M., Wing R.A., Price H.J., McKnight T.D. A rapid procedure for the isolation of C0t-1 DNA from plants // *Genome*. 1997. V.40. P.138-142.

DIVERSITY OF THE METHODS FOR OBTAINING RANDOM FRAGMENTED DNA

Matniyazov R.T.,¹ Chemeris D.A.,¹ Kuluev A.R.,¹ Zubov V.V.,² Chemeris A.V.¹

¹Institute of Biochemistry and Genetics of Ufa Science Centre of Russian Academy of Sciences, Ufa

²Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, Puschino

Resume

A variety of methods is discussed for random DNA fragmentation by physical factors, chemical agents, enzymes and enzyme mixes and by PCR with nonspecific primers. Huge attention is paid to various commercial DNA fragmentation devices and kits for a full-genomic sequencing. The historical background of DNA fragmentation is briefly considered. The quoted literature, mostly methodical, covers more than 70 years period.

Keywords: DNA, fragmentation, genome, sequencing, whole genome sequencing, hydrodynamic shock, cavitation, nebulizing, ultrasound, PCR, DNase, transposase, dsDNA Fragmentase, Nextera, MuSeek