

JEDNOSMĚRNÉ SEKVENOVÁNÍ PCR PRODUKTŮ *MBL2* GENU POMOCÍ POLYADENYLOVANÉHO SEKVENAČNÍHO PRIMERU

MARTIN BERÁNEK^a, MONIKA DRASTÍKOVÁ^a,
VLADIMÍR BUCHTA^b, JAN KESTŘÁNEK^c, JIŘÍ
ŠPAČEK^c a JIŘÍ PETERA^d

^a Ústav klinické biochemie a diagnostiky, ^b Ústav klinické
mikrobiologie, ^c Porodnická a gynekologická klinika,
^d Onkologická klinika, Lékařská fakulta Univerzity Karlovy
a Fakultní nemocnice Hradec Králové
beranek@lfhk.cuni.cz

Došlo 3.2.12, přijato 7.6.12.

Rukopis byl zařazen k tisku v rámci placené služby
urychleného publikování.

Klíčová slova: DNA, polymorfismus, sekvenování, PCR,
polyadenylovaný primer

Úvod

Amplifikační primery, jednořetězcové oligomery o délce kolem 20 nukleotidů, jsou nezbytnou součástí polymerasové řetězové reakce (PCR). Modifikace jejich struktury na 5' konci zvýšily účinnost inzerce produktů PCR do klonovacích vektorů¹ a připojením nukleotidů obsahujících guaninové a cytosinové báze (tzv. GC clampy) byly zdokonaleny metody denaturační gradientové gelové elektroforézy (DGGE)², alelově specifické amplifikace³ a real-time PCR (sondy Scorpions)^{4,5}. Značení 5' konců primerů se využívá u hybridizačních metod⁶, při Sangerově sekvenování⁷, fragmentační analýze⁸ a pyrosekvenování⁹. Nové sekvenovací metody, označované jako „next generation sequencing“, napojují k 5' koncům primerů tzv. adaptory nezbytné pro provedení emulzní PCR a pro identifikaci jednotlivých ampliconů¹⁰.

Převážná většina diagnostických laboratoří pracuje při sekvenování s klasickými nemodifikovanými primery a značenými dideoxynukleotidy, k separaci fragmentů se používá multikapilární elektroforéza. Délky sekvenovaných úseků se pohybují mezi 400 až 700 nukleotidy. Při tzv. konfirmačním sekvenování, kdy se u daného pacienta ověřuje výsledek analýzy DNA dosažený jinou vyšetřovací metodou, bývají obvyklé délky PCR produktů 200 až 400 bp; v případě real-time PCR dokonce jen 100–200 bp.

Čitelnost sekvence při dideoxynukleotidovém sekvenování začíná obvykle 25–50 nukleotidů za 3' koncem použitého primeru. Příčinou ztráty této iniciální sekvence je jednak purifikační proces, jehož účelem je eliminace

nukleotidů, solí, primerů a dalších látek nespotebovaných při sekvenovací reakci, a jednak nízká separační účinnost kapilární elektroforézy pro krátké produkty sekvenovací reakce. V případě velmi krátkých ampliconů může nečitelnost této oblasti vést k nejistým výsledkům konfirmačního sekvenování. Zpravidla je proto nutné provádět obousměrné sekvenování, zaklonování produktu do vektoru nebo reamplifikaci daného úseku genu s primery, které vymezují rozsáhlejší část DNA. Všechny tyto procedury navyšují náklady na vyšetření a prodlužují čas laboratorní odezvy.

Při reamplifikaci rozsáhlejšího úseku DNA může docházet k celé řadě komplikací. Analyzovaný úsek může ležet v blízkosti oblasti bohaté na GC nukleotidy nebo repetitivní sekvence. Amplifikace delších úseků bývá také obtížnější u vzorků s vyšším podílem degradované nukleové kyseliny (analýza DNA z parafinových bločků nebo analýza RNA v biologickém materiálu bez stabilizace). Třetí komplikací může být nedostatek DNA k provedení reamplifikace jako takové (analýza DNA z krevní plasmy, likvoru, plodové vody, slin, vlasových kořínků, nehtů, apod.) a k obousměrnému konfirmačnímu sekvenování je nutno použít původní amplicony.

Cílem této práce je prezentovat na příkladu analýzy genu *MBL2* (lokalizace 10q11.2 – q21) u pacientek s chronickým vulvovaginálním dyskomfortem jednu z možností, jak při jednosměrném dideoxynukleotidovém sekvenování zlepšit čitelnost příslušného ampliconu, a to polyadenylací 5' konce použitého sekvenovacího primeru. MBL (mannose-binding lectin) je sérový protein, který vazbou na sacharidové zbytky na povrchu mikroorganismů zahajuje aktivaci komplementu lektinovou cestou. Nízké sérové koncentrace MBL mají souvislost s polymorfismy v promotorové sekvenci *MBL2* genu, ve 4. pozici nepřekládané oblasti na 5' konci a v prvním exonu genu (kodony 52, 54 a 57)¹¹. Vyšetření *MBL2* genu pomocí dideoxynukleotidového sekvenování umožňuje oproti jiným metodám (analýza restričních fragmentů, hybridizace⁶, alelově specifická amplifikace¹², heteroduplexová analýza¹³, real-time PCR¹⁴, multiplexní PCR¹¹, atd.) získat spolehlivé informace o všech zmíněných polymorfních místech a identifikovat přítomné mutace na základě velmi malého počtu provedených analýz.

Experimentální část

Charakteristika vyšetřovaných vzorků

S informovaným souhlasem byly vyšetřeny 24 vzorky DNA pacientek s diagnózou rekurentní vulvovaginální kandidóza (medián věku 33 roků, rozmezí 18–47 roků) a 24 vzorky zdravých žen (medián 31 roků, rozmezí 25–54 roků). Z deseti náhodně vybraných vzorků bylo do plastové zkumavky odebráno po 10 μl DNA a vytvořený směšný vzorek byl použit pro optimalizaci délky chvostu a pro porovnání délky čitelné sekvence.

Optimalizace délky polyadenylačního chvostu

Amplifikační směs pro PCR (objem 25 μ l) obsahovala 2,5 μ l 10 \times koncentrovaného PCR pufru s chloridem hořečnatým o koncentraci 15 mmol l⁻¹ (Takara, Japonsko), deoxynukleotidy (finální koncentrace ve směsi 200 μ mol l⁻¹, Takara), amplifikační primery purifikované metodou HPLC (300 nmol l⁻¹; IDT, USA), 1 U *Taq* DNA polymerasy (Takara) a 50 ng směsné DNA. Amplifikační primery pokrývající oblast polymorfních míst v prvním exonu a ve 4. pozici nepřekládané oblasti genu měly následující složení: přímý (forward) primer: 5'-GCC TGC ACC CAG ATT GTA G-3' (primer *A*); reverzní primer 5'-ATT GCA GAG ACA GAA CAG CCC-3' (primer *B*). Teplotní podmínky PCR v termocykléru ABI 2720 (Applied Biosystems, USA) zahrnovaly iniciální denaturaci 5 min při 95 °C a 30 amplifikačních cyklů (denaturace 30 s při 95 °C, hybridizace 30 s při 60 °C, elongace 30 s při 72 °C). Amplikony dlouhé 317 bp byly 90 min elektroforeticky separovány na 2% agarosovém gelu s ethidiumbromidem při 100 V.

Amplikony byly purifikovány soupravou „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen) a použity pro sekvenování. Sekvenační reakce (20 μ l) obsahovala 6 μ l komerční reakční směsi s pufrem, optimalizovanou koncentrací chloridu hořečnatého, deoxynukleotidů, dideoxynukleotidů a s termostabilní DNA polymerasou („BigDye XTerminator Kit“ verze 3.1, Applied Biosystems), 5 μ l purifikovaného amplikonu a sekvenační primer ve finální koncentraci 500 nmol l⁻¹. Pro reakci byly použity tyto primery: primer *A* (popsaný výše), 5'-(polyA)₃₁-GCC TGC ACC CAG ATT GTA G-3' (primer *C*, celková délka primeru 50 nukleotidů); 5'-(polyA)₈₁-GCC TGC ACC CAG ATT GTA G-3' (primer *D*, 100 nukleotidů); 5'-(polyA)₁₃₁-GCC TGC ACC CAG ATT GTA G-3' (primer *E*, 150 nukleotidů); 5'-(polyA)₁₈₁-GCC TGC ACC CAG ATT GTA G-3' (primer *F*, 200 nukleotidů).

Vlastní reakce začínala minutovou denaturací při 96 °C, po které následovalo 35 amplifikačních cyklů (denaturace 20 s při 96 °C, hybridizace 20 s při 50 °C a elongace 4 min při 60 °C). Přečištění produktů reakce bylo provedeno gelovou filtrací (souprava „BigDye XTerminator Purification Kit“, Applied Biosystems) dle pokynů výrobce s délkou inkubace 20 min za neustálého třepání; poté následovala dvouminutová centrifugace při 1000 g, tepelná denaturace odděleného supernatantu a jeho analýza na genetickém analyzátoru ABI 3130 (Applied Biosystems). Elektroforetické podmínky při sekvenování byly: délka kapiláry 36 cm, polymer POP7 (obě položky Applied Biosystems), elektrokinetický nástřik vzorků 8 s při 1,2 kV; separace fragmentů 30 min při 8,5 kV a teplotě 60 °C. Pro vyhodnocení sekvencí byl použit program Sequencing Analysis Software, verze 5.3.1 (Applied Biosystems).

Porovnání délky čitelné sekvence

Pomocí primerů *A* a *B* byly amplifikovány produkty o délce 317 bp dle podmínek uvedených výše. Templátem pro PCR byla směsná DNA. Sledovaná polymorfní místa

v nepřekládané a v kódující oblasti *MBL2* genu ležely v blízkosti opačných konců vznikajících produktů. Amplikony byly po přečištění použity pro sekvenační reakce s primery *A* a *C*. Purifikace produktů reakce byla provedena třemi různými postupy: ethanolovou precipitací, mikrokolonkovým systémem založeným na adsorpci produktů k modifikovanému silikagelu (souprava „innuPREP DYE-pure Kit“, Analytik Jena, SRN) a soupravou „BigDye XTerminator Purification Kit“. U posledně zmíněné purifikace byly vyzkoušeny tři různé inkubační časy: 10, 20 a 30 min. Podmínky při sekvenování na genetickém analyzátoru ABI 3130 byly obdobné jako při optimalizaci délky chvostu. Všechny experimenty byly provedeny v triplikátech.

Vyšetření klinických vzorků

Pro PCR byly použity opět primery *A* a *B*. Sekvenační reakce zahrnovala primer *C*. Purifikace produktů reakce byla provedena soupravou „BigDye XTerminator Purification Kit“ s dobou inkubace 20 min. Výsledky vyšetření dosažené sekvenováním s polyadenylovaným primerem *C* byly u všech testovaných vzorků potvrzeny sekvenováním opačného vlákna s primerem *B*. Identifikované alely byly označeny dle používané nomenklatury: alela *A* (wild-type); *B* (54Asp); *C* (57Glu); *D* (52Cys); *P* (ve 4. pozici nepřekládané oblasti *MBL2* genu se nachází cytosin); *Q* (v téže pozici je namísto cytosinu thymin). Populační studie definovaly pro námi sledované oblasti těchto pět možných haplotypů: *PA*, *QA*, *PB*, *PD* a *QC*¹⁵. Pro hodnocení výskytu jednotlivých alel, haplotypů a genotypů v obou vyšetřovaných souborech byl použit chí-kvadrátový test. Za statisticky významné byly považovány hodnoty $P \leq 0,05$.

Výsledky

Optimalizace délky polyadenylačního chvostu

Sekvenační primery použité pro optimalizaci se vzájemně lišily velikostí polyadenylačního chvostu. Neadenylovaný primer *A* obsahoval 19 nukleotidů, primer *C* s nejkratším chvostem 50 nukleotidů a primer *F* s nejdelším chvostem byl dlouhý 200 nukleotidů. Maximální délka primeru použitelného pro účinnou sekvenační reakci byla 100 nukleotidů. U delších primerů byla čitelnost získaných nukleotidových sekvencí velmi krátká. Průměrná intenzita fluorescence piků v produktech sekvenační reakce byla v případě použití primerů *E* a *F* méně než poloviční oproti produktům reakce s primery *A*, *C* a *D*.

Porovnání délky čitelné sekvence

Jak je patrné z tab. I, čitelnost řetězce začínala v případě neadenylovaného sekvenačního primeru 24–26 nukleotidů od 3' konce primeru. Ve vzorcích s adenyllovaným primerem *C* byl ve většině případů počátek čtení posunut

Tabulka I

Délka čitelné sekvence amplikonu v závislosti na použité purifikaci sekvenačních produktů

Purifikační procedura ^{a,b}	Fluorescence produktů sekvenační reakce (průměr)		Délka čitelné sekvence (počet nukleotidů)		Pořadí prvního čitelného nukleotidu	
	Primer <i>A</i>	Primer <i>B</i>	Primer <i>A</i>	Primer <i>B</i>	Primer <i>A</i>	Primer <i>B</i>
BigDye X (10 min)	803	1266	274	298	25.	1.
BigDye X (20 min)	1023	1004	275	298	24.	1.
BigDye X (30 min)	1319	1183	258	287	41.	12.
Ethanolová precipitace	925	556	275	298	24.	1.
innuPREP	1031	1152	273	298	26.	1.

^a BigDye X = komerční souprava BigDye X Terminator Purification Kit; ^b innuPREP = souprava innuPREP DYEpure (viz Experimentální část)

těsně za 3' konec primeru. Výjimkou byla purifikace pomocí soupravy „BigDye X Terminator Purification Kit“ s dobou inkubace 30 min, kde čitelnost začínala až od 12. nukleotidu.

Vyšetření klinických vzorků

Výsledky jednosměrného sekvenování s polyadenylovaným primerem byly shodné s výsledky obousměrného sekvenování s neadenylovanými primery *A* a *B*. Ani v jedné ze sledovaných proměnných (frekvence alel, haplotypů a genotypů) nebyl shledán statisticky významný rozdíl mezi oběma soubory. Nejvyšší zastoupení měly alely *A* (exon 1; 83 % u obou souborů) a *P* (nepřekládaná oblast genu; 79 % u vyšetřovaného a 73 % u kontrolního souboru), které neovlivňují hladinu MBL proteinu. Alelu *C* jsme ani v jedné ze skupin nezaznamenali. V obou skupinách jsme zachytili čtyři z pěti haplotypů, jež se vyskytují v běžné populaci: *PA*, *PB*, *PD* a *QA*. Nejvyšší zastoupení měl haplotyp *PA* (62 % ve vyšetřované skupině a 56 % u kontrol).

Diskuse

Modifikace primerů používaných při sekvenační reakci se značenými dideoxynukleotidy skýtá nové možnosti pro molekulární diagnostiku. Naše studie prokázala, že polyadenylace primeru na 5' konci umožňuje přečíst při jednosměrném sekvenování celou sekvenci vyšetřovaných PCR produktů. V případě krátkých amplikonů může prodloužení čitelnosti o 20 až 30 nukleotidů zvýšit pravděpodobnost záchytu mutace související s daným onemocněním, rozšířit počet vyšetřitelných polymorfních míst v jednom amplikonu (případ naší analýzy genu *MBL2*) nebo zabezpečit spolehlivější identifikaci nukleové kyseliny infekčního mikroorganismu.

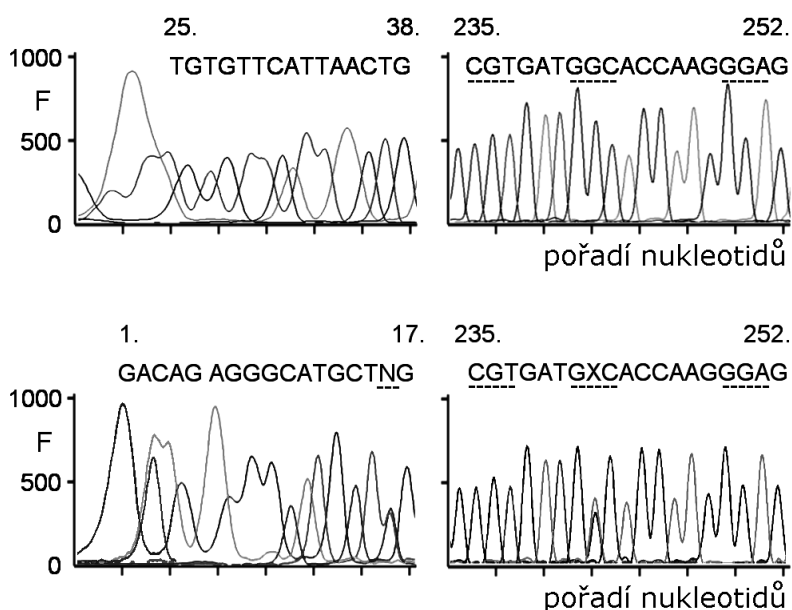
Nezbytnou podmínkou používání adenylovaných primerů pro účely sekvenování je jejich kompletní syntéza

a purifikace metodou HPLC. Důležité je také určení správné délky jejich chvostu. Délka se odvozuje ze ztráty krátkých sekvenačních produktů během purifikace a je pro každou reakci individuální. Tab. I ukazuje, že v našem případě purifikace způsobila ztrátu prvních 25 nukleotidů za 3' koncem neadenylovaného primeru, viz obr. 1 (levý horní elektroforeogram; osa X znázorňuje pořadí nukleotidů, osa Y fluorescenci sekvenačních produktů, F; čitelnost začíná od 25. nukleotidu za 3' koncem primeru a neobsahuje žádné polymorfní místo). Z tohoto důvodu nebylo možné určit alely *P* a *Q* v nepřekládané oblasti genu a následovalo sekvenování opačného vlákna. Pravý horní elektroforeogram v obr. 1 ukazuje pokračující sekvenci s neadenylovaným primerem *A*, kde se v oblasti mezi 235. a 252. nukleotidem nacházejí tři sledovaná polymorfní místa (podtržená) v 52., 54. a 57. kodonu (CGT, GGC, GGA, zleva doprava), sledovaná osoba je homozygot s alelou *A* na obou homologních chromosomech.

Zlepšení čitelnosti bylo dosaženo připojením chvostu o délce 31 nukleotidů na 5' konec primeru *C* (obr. 1, levý dolní elektroforeogram). Čitelná oblast začíná díky adenylaci od 1. nukleotidu za 3' koncem primeru a obsahuje sledované polymorfní místo z nepřekládané oblasti genu (podtržené písmeno N), vyšetřovaná osoba je heterozygot s alelami *P* a *Q*. Na pravém dolním elektroforeogramu je patrná pokračující sekvence s adenylovaným primerem *C*; vyšetřovaná osoba je heterozygot s alelami *A* a *B* (podtržený triplet GXC uprostřed elektroforeogramu). Díky adenylaci primeru bylo možno z dolních elektroforeogramů určit výsledný genotyp vyšetřované osoby *PB/QA*.

Délky navržených adenylačních chvostů odpovídají obvyklým délkám GC clampů u DGGE² a délkám adaptérů určených pro sekvenátory nové generace¹⁰.

Při purifikaci produktů soupravou „BigDye X Terminator Purification Kit“ s dobou inkubace 30 min nebylo dosaženo požadované délky čitelné sekvence u adenylovaného ani u neadenylovaného primeru (tab. I). Přestože je tato doba inkubace doporučována výrobcem soupravy, dochází při ní k významně vyšší afinitě krátkých produktů

Obr. 1. Výsledky sekvenování ampliconu genu *MBL2*

k purifikačnímu médiu a k jejich absenci v supernatantu. Řešením je zde zkrácení doporučeného inkubačního času na 20 min nebo prodloužení adenylačního chvostu na 40 až 45 nukleotidů.

Prodlužování chvostu má však své limity. Účinnost sekvenační reakce s adenylowanými primery o délce 100 až 200 nukleotidů byla nepřímo úměrná délce chvostu. Příčinou nízké efektivity „hyperadenylowaných“ primerů mohou být sterické důvody způsobené samotným chvostem.

Primárním cílem této studie nebylo vzhledem k počtu vyšetřených osob hledání kausálního vztahu mezi genetickými polymorfismy a výskytem rekurentních kandidóz. Toto infekční onemocnění postihuje nezanedbatelnou část ženské populace (1–3 %) a je vzhledem k jeho multifaktoriální povaze obtížně diagnostikovatelné a léčitelné¹⁶. Analýza polymorfismu v genu *MBL2* by tak mohla napomoci při vyhledávání rizikových pacientek, k upřesnění diagnostiky, a tím i následné terapie. Z našich prvních výsledků se zdá, že mezi vyšetřenými pacientkami a kontrolami nejsou výrazné rozdíly ve výskytu rizikových alel *B*, *C*, *D*, případně *Q*, které podmiňují nižší koncentrace sérového proteinu MBL. Frekvence alel v obou skupinách se významně nelišily od výsledků dosud provedených studií^{11,17,18}. Definitivní závěry z hlediska vztahu mezi výskytem vulvovaginálních kandidóz a genetickými polymorfismy v genu *MBL2* však bude možno učinit až po analýze většího počtu vzorků paletou vyšetření zahrnujících kromě sledovaných polymorfismů také polymorfni místa v promotorové oblasti genu¹⁸.

Závěr

Připojení polyadenylačního chvostu na 5' konec sekvenačních primerů prodlužuje délku čitelné sekvence ampliconů. V případě genetického polymorfismu v genu *MBL2* umožnila adenylace primeru při jednosměrném sekvenování vyšetřit všechna polymorfni místa v jediném ampliconu. Pro dosažení dostatečné účinnosti sekvenační reakce je nezbytné používat adenylované primery o délce desítek nukleotidů purifikované metodou HPLC a navržené tak, aby netvořily sekundární struktury. Při splnění těchto podmínek je polyadenylace sekvenačního primeru univerzálním, rychlým a levným způsobem, jak dospět ke kompletní čitelnosti krátkých ampliconů.

Seznam zkratek

bp	počet párů bází
DGGE	denaturační gradientová gelová elektroforéza
GC clampy	oligonukleotidové řetězce bohaté na nukleotidy s guaninem a cytosinem
MBL	proteinový produkt genu <i>MBL2</i>
<i>MBL2</i>	název genu (z angl. mannose-binding lectin)
PCR	polymerasová řetězová reakce
<i>Taq</i>	bakterie <i>Thermus aquaticus</i>

Tato práce byla finančně podpořena prostředky Centra základního výzkumu č. LC531 MŠMT a grantovým projektem Interní grantové agentury MZ ČR č. NT11334-4/2010.

LITERATURA

1. Espelund M., Jacobsen K. S.: *Biotechniques* 13, 74 (1992).
2. Sheffield V. C., Cox D. R., Lerman L. S., Myers R. M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 232 (1989).
3. Fonseca-Coronado S., Vaughan G., Cruz-Rivera M. Y., Carpio-Pedroza J. C., Ruiz-Tovar K., Ruiz-Pacheco J. A., Escobar-Gutiérrez A.: *J. Clin. Microbiol.* 49, 2706 (2011).
4. Whitcombe D., Theaker J., Guy S. P., Brown T., Little S.: *Nat. Biotechnol.* 17, 804 (1999).
5. Thelwell N., Millington S., Solinas A., Booth J., Brown T.: *Nucleic Acids Res.* 28, 3752 (2000).
6. Madsen H. O., Garred P., Kurtzhals J. A., Lamm L. U., Ryder L. P., Thiel S., Svejgaard A.: *Immunogenetics* 40, 37 (1994).
7. Sanger F., Coulson A. R.: *J. Mol. Biol.* 94, 441 (1975).
8. Fregeau C. J., Fourney R. M.: *Biotechniques* 15, 100 (1993).
9. Doehring A., Hofmann W. P., Schlecker C., Zeuzem S., Susser S., Geisslinger G., Sarrazin C., Lotsch J.: *Antiviral Ther.* 15, 1099 (2010).
10. Ansorge W., Sproat B., Stegemann J., Schwager C., Zenke M.: *Nucleic Acids Res.* 15, 4593 (1987).
11. Skalníková H., Freiburger T., Chumchalová J., Grombířková H., Šedivá A.: *J. Immunol. Methods* 295, 139 (2004).
12. Davies E. J., Snowden N., Hillarby M. C., Carthy D., Grennan D. M., Thomson W., Ollier W. E. R.: *Arthritis Rheum.* 38, 110 (1995).
13. Jack D., Bidwell J., Turner M., Wood N.: *Hum. Mutat.* 9, 41 (1997).
14. Van Hoeyveld E., Houtmeyers F., Massonet C., Mogens L., Van Ranst M., Blanckaert N., Bossuyt X.: *J. Immunol. Methods* 287, 227 (2004).
15. Mullighan C. G., Marshall S. E., Welsh K. I.: *Scand. J. Immunol.* 51, 111 (2000).
16. Špaček J., Buchta V., Jílek P., Krejsek J., Pidrman V., Kalousek I., Matula V., Kestránek J., Drahošová M., Vejsová M., Förstl M.: *Čes. Gynek.* 73, 179 (2008).
17. Babula O., Lazdane G., Kroica J., Ledger W. J., Witkin S. S.: *Clin. Infect. Dis.* 37, 733 (2003).
18. Crosdale D. J., Poulton K. V., Ollier W. E., Thomson W., Denning D. W.: *J. Infect. Dis.* 184, 653 (2001).

M. Beránek^a, M. Drastíková^a, V. Buchta^b, J. Kestránek^c, J. Špaček^c, and J. Petera^d (^a*Institute of Clinical Biochemistry and Diagnostics*, ^b*Institute of Clinical Microbiology*, ^c*Department of Obstetrics and Gynaecology*, ^d*Department of Oncology, Faculty of Medicine and Faculty Hospital Hradec Králové*): **Single-Strand Sequencing of PCR Products of the MBL2 Gene with a Polyadenylated Sequencing Primer**

Standard dideoxynucleotide sequencing is not able to provide complete sequences of analysed amplicons. First 25–50 nucleotides after the 3' end of sequencing primers are usually lost because of cleaning procedures performed to remove excess of primers, nucleotides, salts, and other contaminants. A new possibility is described of increasing readability of the initial part of short PCR amplicons using a sequencing primer modified by a polyadenylated tail attached to its 5' end. In a group of 24 patients with recurrent vulvovaginal candidiasis and 24 healthy subjects we analysed polymorphic sites in the 5' untranslated region (5' UTR) and codons 52, 54, and 57 of the MBL2 gene. Using PCR we amplified 317 bp MBL2 products covering all the polymorphisms. The examined sites lie near both ends of the products. Purified amplicons were used in cycle sequencing reactions containing either conventional or polyadenylated forward primers. The data obtained by the former approach did not contain the initial 25-nucleotide segment with 5' UTR, and double-strand sequencing was necessary. In contrast, the polyadenylated primers enabled complete and reliable readability of the amplicons. Both the approaches provided the same results. Our preliminary data showed that the distribution of MBL2 alleles, haplotypes, and genotypes in the patients and healthy subjects was very similar and the differences were not statistically significant. A broader study is needed to confirm our preliminary results. We revealed that the polyadenylated primer used in the cycle sequencing extends the readable range of MBL2 amplicons without necessity of double-strand sequencing, subcloning or reamplification with other pair of primers.