



УДК 577.151.35:577.113.4:577.2.08

ЭФФЕКТ ПРОСКАЛЬЗЫВАНИЯ В РЕАКЦИИ ЭЛОНГАЦИИ ПРАЙМЕРА ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ 2'-ДЕЗОКСИУРИДИНТРИФОСФАТОВ

© 2020 г. В. А. Василисков**, В. Е. Шершов**, Р. А. Мифтахов**,
В. Е. Кузнецова**, С. П. Радько*, ***, А. В. Лисица***, С. А. Лапа**,
С. А. Суржиков**, Э. Н. Тимофеев**, А. С. Заседателей**, А. В. Чудинов*, **, #

*ООО «ИБМХ-ЭкоБиоФарм», Россия, 119121, Москва, ул. Погодинская, 10, стр. 8

**ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Россия, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32

***Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича Российской академии
медицинских наук, Россия, 119121, Москва, ул. Погодинская, 10, стр. 8

Поступила в редакцию 01.11.2019 г.

После доработки 29.11.2019 г.

Принята к публикации 10.12.2019 г.

Выявлен эффект проскальзывания праймерной цепи в реакции элонгации праймера на гомополимерной матрице при использовании модифицированных аналогов dUTP. Эффект наблюдается при использовании Vent(exo-) ДНК полимеразы и в заметной степени подавляется добавлением к реакционной смеси природных нуклеотидов dATP (2'-дезоксиаденозинтрифосфат), dCTP (2'-дезоксцитидинтрифосфат) и dGTP (2'-дезоксигуанозинтрифосфат).

Ключевые слова: модифицированные нуклеотиды, реакция элонгации праймера, проскальзывание

DOI: 10.31857/S0132342320030331

ВВЕДЕНИЕ

Модифицированные 2'-дезоксинуклеозид трифосфаты нашли широкое применение при отборе высокоаффинных ДНК аптамеров методом SELEX [1]. В качестве модифицированных нуклеотидов чаще всего используют аналоги 2'-дезоксидинтрифосфата (dUTP), содержащие модификацию в положении 5 урацила. Эффективность аналога в качестве субстрата ДНК полимераз оценивается, как правило, в реакции элонгации праймера.

Одной из основных характеристик модифицированного субстрата является его способность к многократному встраиванию с образованием полностью модифицированного участка. Для оценки этого параметра в реакции элонгации праймера используют ДНК-матрицу, содержащую гомополимерный участок типа (dA)_n. Однако, как пока-

зано в настоящей работе, при использовании гомополимерной матрицы интерпретация результатов может осложняться из-за эффекта проскальзывания цепи (slippage). При исследовании субстратных характеристик новых модифицированных нуклеотидов на основе амидов аминоксил-дUTP мы обнаружили выраженный эффект проскальзывания праймерной цепи.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе мы использовали олигонуклеотидную модель, содержащую в матричной цепи фрагмент dA₂₀ (рис. 1, а). Объектами настоящего исследования были неприродные аналоги dUTP (рис. 1, б), синтезированные нами ранее [2]. При проведении реакции удлинения праймера Vent(exo-) ДНК полимеразой с аналогами dUTP обнаружен эффект проскальзывания модифицированной цепи (рис. 2). Для dUTP (**1a**) максимальная длина модифицированной цепи превышала длину матрицы на 15–16 нуклеотидов. Столь выраженный эффект наблюдался лишь при условии добавления к реакционной смеси только неприродного нуклеотида. Введение в реакцию дополнительно смеси dATP, dCTP и dGTP ограничивает число избыточных нуклеотидов до 6–7 (рис. 2б).

Сокращения: dUTP – 2'-дезоксидинтрифосфат; dTTP – 2'-дезокситимидинтрифосфат; dATP – 2'-дезоксиаденозинтрифосфат; dCTP – 2'-дезоксцитидинтрифосфат; dGTP – 2'-дезоксигуанозинтрифосфат; SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) – систематическая эволюция лигандов путем экспоненциального обогащения.

Автор для связи: (тел.: +7 (499) 135-98-00; факс +7 (495) 135-14-05; эл. почта: chud@eimb.ru).

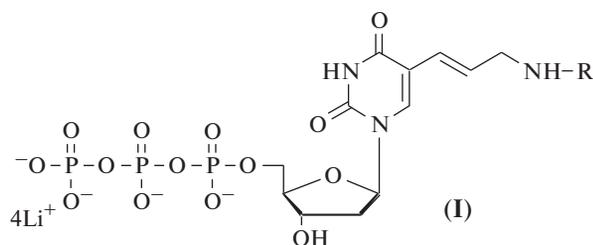


Рис. 1. Строение модифицированных 2'-дезоксигуанидин-5'-трифосфатов (I): (а) $R = C_2H_5$; (б) $R = n-C_3H_7$; (в) $R = n-C_4H_9$, использованных в реакции элонгации праймера.

Несколько менее выраженный эффект проскальзывания наблюдался для двух других нуклеотидов (Iб, Iв). Природный dTTP достраивает праймер до размера матрицы с небольшой примесью $N + 1$ продукта в присутствии Taq ДНК полимеразы. Однако, при использовании Vent(exo-) полимеразы для природного нуклеотида также наблюдается заметный эффект проскальзывания.

Проскальзывание цепей при репликации часто наблюдается на микросателлитных участках ДНК, содержащих короткие повторы (1–6 п.о.). Это явление лежит в основе механизма возникновения коротких *indel* мутаций (insertions/dele-

tions). Исследования показывают, что увеличение длины повторяемого фрагмента или уменьшение количества повторов снижают вероятность проявления эффекта [3]. Важным фактором, способствующим проявлению проскальзывания, является стабилизация выпетленных конфигураций ДНК, способных к дальнейшей элонгации. Стабилизация может осуществляться за счет образования выпетливаний с классическими парами оснований, мисматчами или с неканонической структурой [4–6]. Эффект проскальзывания цепи для неприродных аналогов не обнаружен нами в литературе. Структура модифицированных нуклеотидов I (а–в) допускает участие амидных фрагментов в стабилизации выпетливаний на неприродном участке цепи. Обнаруженный эффект проявляется в условиях, заметно отличающихся от условий отбора аптамеров. В силу этого предполагается, что он не оказывает заметного влияния на результаты селекции с использованием неприродных трифосфатов. Однако проскальзывание может заметно исказить результаты оценки субстратной эффективности неприродных нуклеотидов, особенно в случае малоэффективных субстратов, когда наблюдаемая максимальная длина неприродной цепи не превышает размера матрицы.

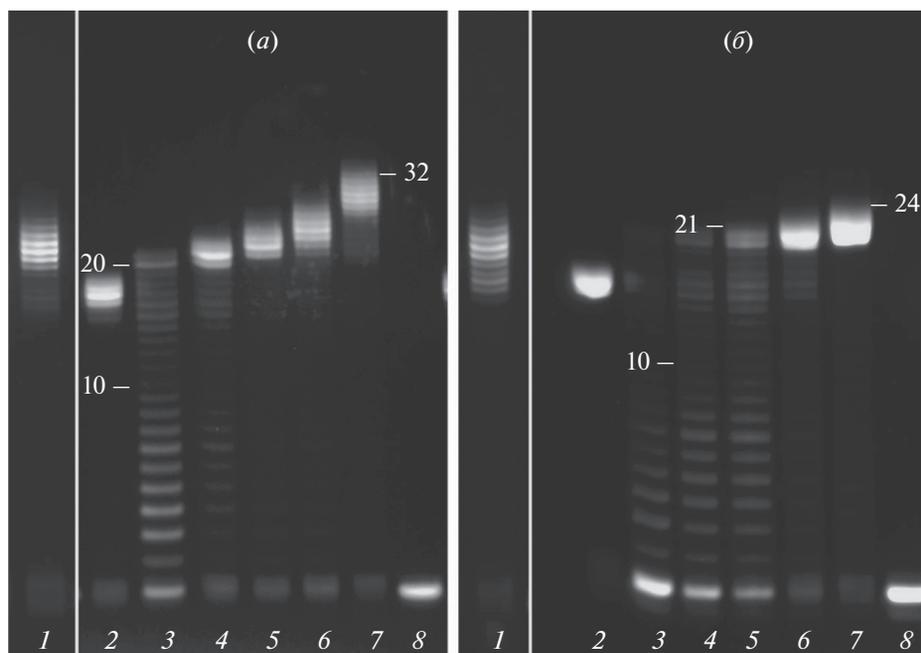


Рис. 2. Электрофоретическое разделение продуктов реакции элонгации праймера с dUTP (Ia) с Vent(exo-) ДНК-полимеразой при добавлении только модифицированного нуклеотида (а) или смеси модифицированного нуклеотида с dATP, dCTP и dGTP (б). Анализ выполнен в денатурирующем полиакриламидном геле (20%) при 50°C. Дорожки 1 и 2 – контроли с dTTP и Vent(exo-) (3 ч) и Taq (1 ч) ДНК полимеразой соответственно. Дорожки (3–7) соответствуют времени проведения реакции 10 с, 1 мин, 5 мин, 30 мин и 3 ч. Дорожка 8 – праймер. Цифрами отмечена разница длин выбранного фрагмента и праймера. Модифицированные цепи отличаются меньшей подвижностью при электрофорезе по сравнению с природной ДНК.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Реакцию достраивания праймера проводили с использованием матрицы М и праймера А (приведены последовательности 5'-3'): (М): (А)₂₀-TTG-TCA-CTC-AGA-CCA-ACT-CCC-T; (Р): Су3-А-АСА-GTG-AGT-CTG-GTT-GAG-GGA. Реакцию элонгации праймера проводили в реакционной смеси (25 мкл), содержащей 4 мкМ праймера, 4 мкМ матрицы, модифицированный dUTP (Ша-г) в концентрации 200 мкМ и Vent(exo-) ДНК-полимеразу (НЕВ, США) в количестве 5 ед. акт. в буфере ThermoPol™ при температуре 72°C. Время элонгации варьировали от 10 с до 3 ч. Продукт реакции разделяли электрофорезом в денатурирующих условиях. Детекцию проводили в диапазоне флуоресценции красителя Су3 с возбуждением при 535 нм и регистрацией при 580 нм.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Федеральной целевой программы "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы" (соглашение № 14.576.21.0096, уникальный идентификатор проекта RFMEFI57617X0096).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lapa S.A., Chudinov A.V., Timofeev E.N. // *Mol. Biotechnology*. 2016. V. 58. P. 79–92.
2. Василисков В.А., Лана С.А., Кузнецова В.Е., Суржи-ков С.А., Шершов В.Е., Спицын М.А., Гусейнов Т.О., Мифтахов Р.А., Заседателева О.А., Лисица А.В., Радко С.П., Заседателев А.С., Тимофеев Э.Н., Чудинов А.В. // *Биорг. хим.* 2019. Т. 45. С. 446–448. [Vasiliskov V.A., Lapa S.A., Kuznetsova V.E., Surzhikov S.A., Shershov V.E., Spitsyn M.A., Guseinov T.O., Miftahov R.A., Zasedateleva O.A., Lisitsa A.V., Radko S.P., Zasedatelev A.S., Timofeev E.N., Chudinov A.V. // *Rus. J. Bioorg. Chem.* 2019. V. 45. p. 221–223.]
3. Liljegren M.M., de Muinck E.J., Trosvik P. // *PLoS One*. 2016. V. 11. P. e0159232.
4. Lo Y.-S., Tseng W.-H., Chuang C.-Y., Hou M.-H. // *Nucl. Acids Res.* 2013. V. 41. P. 4284–4294.
5. Hou M.-H., Robinson H., Gao Y.-G., Wang A.H.J. // *Nucl. Acids Res.* 2002. V. 30. P. 4910–4917.
6. Edwards S.F., Sirito M., Krahe R., Sinden R.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009. V. 106. P. 3270–3275.
7. Huang T.Y., Chang C.K., Kao Y.F., Chin C.H., Ni C.W., Hsu H.Y., Hu N.J., Hsieh L.C., Chou S.H., Lee I.R., Hou M.H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2017. V. 114. P. 9535–9540.

Slippage of the Primer Strand in Primer Extension Reaction with Modified 2'-Deoxyuridine Triphosphates

V. A. Vasiliskov**, V. E. Shershov**, R. A. Miftahov**,
V. E. Kuznetsova**, S. P. Radko*, ***, A. V. Lisitsa***, S. A. Lapa**,
S. A. Surzhikov**, E. N. Timofeev**, A. C. Zasedatelev**, and A. V. Chudinov*, **, #

#Phone: +7 (499) 135-98-00; fax: +7 (495) 135-14-05; e-mail: chud@eimb.ru

*IBMC-EcoBioPharm Ltd., ul. Pogodinskaya 10, Moscow, 119121 Russia

**Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia

***Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, ul. Pogodinskaya 10, Moscow, 119121 Russia

An effect of primer strand slippage was observed in primer extension reaction due to replacement of thymidine triphosphate for modified analogues of dUTP. The effect was detected when using Vent(exo-) DNA polymerase. It is notably suppressed by adding to reaction mixture the natural nucleotides dATP, dCTP, and dGTP.

Keywords: modified nucleotides, primer extension, slippage