

УСКОРЕННЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУБСТРАТНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ dNTP С ДНК-ПОЛИМЕРАЗАМИ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В SELEX

С.А. Лапа, О.С. Волкова, С.В. Вишнякова, В.Е. Шершов, А.В. Чудинов

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Россия

Аптамеры – нуклеиновые аналоги антител. Процесс отбора аптамеров к их мишеням называется SELEX. Для создания аптамеров с расширенными свойствами используют модифицированные dNTPs, которые встраиваются ДНК-полимеразами. При недостаточной совместимости модифицированных dNTPs с полимеразой может происходить конкурентная амплификация последовательностей исходной ДНК-библиотеки. Часто низкая эффективность встраивания модификаций остается незамеченной, но в результате библиотека будет обеднена модифицированными аптамерами.

Ранее нами было показано, что в процессе обогащения ДНК-библиотеки кривая при её амплификации в режиме реального времени с каждым следующим раундом приближается по форме к канонической кривой, характерной для фиксированной последовательности ДНК [1]. Это является показателем обогащения библиотеки специфичными к мишени олигонуклеотидами. Однако, библиотека может обогащаться не специфичными, а наиболее легко амплифицируемыми последовательностями.

Нами предложен метод быстрой оценки субстратной совместимости модифицированных трифосфатов дезоксинуклеозидов и ДНК-полимераз. Для этого проводят три последовательных раунда амплификации исходной ДНК-библиотеки (без трудоемких и сложных стадий селекции аптамеров). В случае совместимости с полимеразой форма кривой остается прежней, при несовместимости – приближается к канонической кривой (Рис. 1).

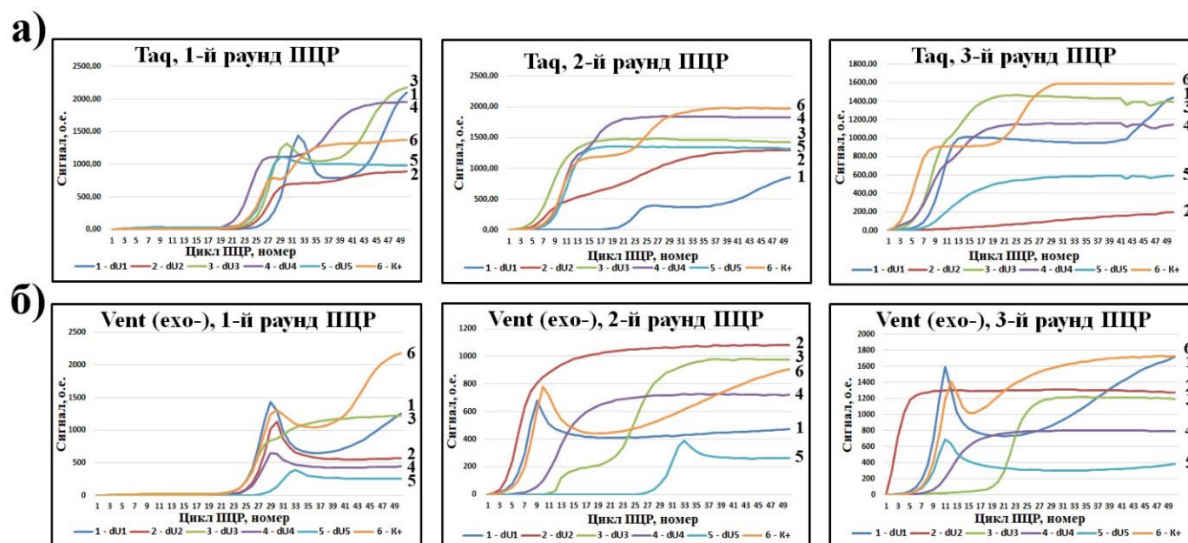


Рисунок 1. Кривые амплификации с модифицированными dUTPs и ДНК-полимеразами: а) Taq и б) Vent (exo-).

Для использования в SELEX пригодны лишь те модифицированные dNTPs, которые на протяжении как минимум трёх раундов амплификации не меняют характер кривой накопления сигнала.

Исследование поддержано грантом РФФИ № 19-04-01217.

Литература

1. С.П. Радько, С.А. Лапа, А.В. Чудинов, С.А. Хмельва, М.М. Маннанова., Л.К. Курбатов, Я.Ю. Киселёва, А.С. Заседателей, А.В. Лисица. Оценка разнообразия комбинаторных ДНК-библиотек на основе анализа формы амплификационных кривых для мониторинга эффективности селекции аптамеров. // Биомед. Хим. – 2019. – Т. 65. – Стр. 477–484.