

ПОВЕДЕНИЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ DU И DC ДЛЯ ДНК-МАТРИЦ РАЗЛИЧНОГО GC-СОСТАВА В ПЦР

С.В. Вишнякова, А.В. Чудинов, С.А. Лапа

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

Введение различных функциональных групп по азотистому основанию нуклеозидтрифосфатов позволяет получать модифицированные ДНК с новыми физико-химическими свойствами [1]. Такие ДНК могут использоваться для создания аптамеров (нуклеиновых аналогов моноклональных антител для применения в диагностике и терапии) и зондов с увеличенными средством к их молекулярным мишеням [2].

Проведена серия экспериментов по встраиванию модифицированных дезоксиуридинов и дезоксицитидинов (mod-dU, mod-dC) при амплификации фрагментов генов *Staphylococcus aureus* и *Mycobacterium tuberculosis*. Функциональные группы 3-метилбутановой, фенилбутановой, индолэтановой и индолпропановой кислот были присоединены по 5-положению пиримидиновых оснований. Выбраны GC- и AT-богатые матрицы, содержащие несколько повторов поли-G (поли-C) и поли-A (поли-T) для сравнения субстратного поведения модифицированных dU и dC. Проводили ПЦР в режиме реального времени с замещением природных dTTP и dCTP на их модифицированные аналоги с использованием полимераз Taq и Vent (exo-) с отсутствующей 3' – 5' экзонуклеазной активностью. Рассчитывали эффективность амплификации «Е», а также выход целевого продукта по электрофореграмме (использовали программу «Image J» (NIH, США).

Участок *S. aureus*

ACTCGACTGAGGATAAAGCGTCTCAAGATAAGTCTAAAAGATCATCATAATGGCAAAAAAGG
TGCAGCGATCGGTGCTGGAACAGCAGGTTTGGCTGGAGGCGCAGCAAGTAAAAGTGCTTCTGC
CGCTTCAAAACACATGCCTCTAATAATGCAAGCCAAAAACCATGATGAACATGACAATCATGA
CAGAGATAAAGAACGTAAAAAAGGTGGCATGGCCAAAGTATTGTTACCATTAAATTGCAGCTGT
ACTAATTATCGGTGCATTAGCGATATTTGGA

Участок *M. tuberculosis*

CGCCGCGATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGAGCCAATTTCATGGACCAGAACAAACC
CGCTGTCTGGGGTTGACCCACAAGCGCCGACTGTGGCGCTGGGGCCCGGCGGTCTGTCACGT
GA

Полученные результаты указывают не только на влияние модификации в азотистом основании на субстратную эффективность, но и на сильное влияние GC-состава матрицы для амплификации (см. Рисунок). Так, на GC-богатой матрице эффективность mod-dU выше, и наоборот. Интересно, что этот эффект наблюдали только при полном замещении природных трифосфатов на модифицированные аналоги. По-видимому, основную роль в снижении эффективности играет наличие поли-повторов, что усложняет встраивание модифицированных аналогов.

Проведенная работа может быть полезна при выборе модификаций и природы нуклеотидов (dU или dC) для в зависимости от GC-состава применяемых матриц при создании модифицированных ДНК, специфических зондов и аптамеров.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ 22-14-00257

Литература

- Lapa S.A., Chudinov A.V., Timofeev E.N. The Toolbox for Modified aptamers // Molecular biotechnology. – 2016. – V.58, № 2. – P. 79–92.
- Hollenstein M., Rothlisberger P. Aptamer chemistry // Advanced drug delivery reviews. – 2018. – V. 134. – P. 3–21.