

**ФЕРМЕНТАТИВНОЕ ПОЛУЧЕНИЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ДНК-БИБЛИОТЕК
С ПОМОЩЬЮ РАЗЛИЧНЫХ ДНК-ПОЛИМЕРАЗ****В.Е. Кузнецова, В.Е. Шершов, Р.А. Мифтахов, А.В. Чудинов***Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия*

В настоящее время ДНК аптамеры рассматриваются в качестве не дорогой синтетической альтернативы антителам. Модифицированные ДНК аптамеры представляют собой перспективный класс высоко-аффинных лигандов, устойчивых к биодеградации. Разработаны многочисленные методы селекции как природных, так модифицированных аптамеров, в том числе клеточный SELEX. Этот вариант селекции позволяет выявить высокоаффинные варианты аптамеров, которые связываются со специфическими рецепторами на поверхности клеток. Одним из этапов процедуры селекции аптамеров является стадия амплификации, которая предполагает субстратную совместимость химически модифицированного 2'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфата с используемой ДНК-полимеразой. С синтетической не модифицированной комбинаторной библиотеки ДНК в реакции достраивания праймера (primer extension) получали библиотеку модифицированных ДНК при полной замене dTTP на производное дезоксиуридинтрифосфата, модифицированное фрагментом фенилуксусной кислоты, присоединенной по 5-положению транс-алкеновым линкером.

Синтетическая не модифицированная комбинаторная библиотека ДНК представляет собой набор одноцепочечных ДНК (5'-GCT CCT GAC GAT CGA CGA CCG AG-(N)40-GCA ACT GCA GCA TGC TTC GCA TT-3'), каждая из которых фланкирована стандартными последовательностями для связывания праймеров при амплификации, а центральная часть – вырождена. Праймер маркирован по 5'-концу флуоресцентным красителем Cy3. Реакцию достраивания праймера проводили в реакционной смеси (100 мкл), содержащей 6 мкМ праймер, 4 мкМ матрицу, dCTP, dATP, dGTP и модифицированный dUTP в концентрации 200 мкМ и ДНК-полимеразу в количестве 10 ед. акт. в рекомендованном производителем буфере при температуре 72 °С в течение 1 ч. Как видно из рисунка, при использовании Vent (exo-), Deep Vent (exo-) и Bst ДНК-полимераз обнаруживается смесь ДНК-продуктов различной длины, в то время как применение Kod XL и Pwo ДНК-полимераз приводит к преимущественному образованию ДНК-продукта нужной длины (рисунок 1).

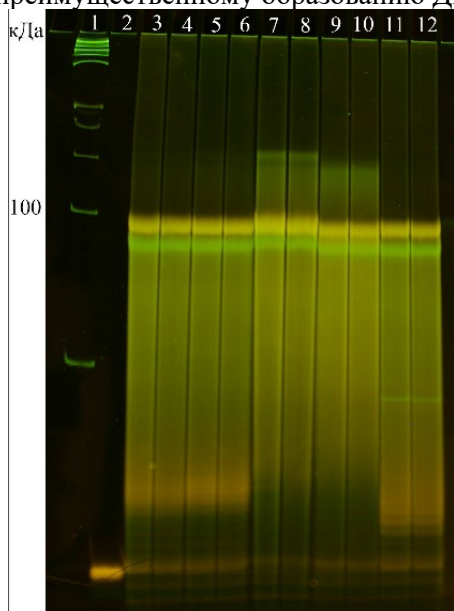


Рисунок 1 – Электрофоретическое разделение продуктов реакции удлинения праймера (primer extension) при использовании различных ДНК-полимераз (в двух повторах). Дорожка: 1 – маркер длин; 2 – праймер; 3, 4 – Vent (exo-) ДНК-полимераза; 5, 6 – Deep Vent (exo-) ДНК-полимераза; 7, 8 – Kod XL ДНК-полимераза; 9, 10 – Pwo ДНК-полимераза; 11, 12 – Bst ДНК-полимераза. Денатурирующий полиакриламидный гель (15 %-й, соотношение акриламид–бисакриламид, 19 : 1), 60 °С. Изображение геля получали путем инкубирования геля в растворе красителя Sybr Green.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ МК № 18–29–09151\18.