

УДК 577.113.4

ИССЛЕДОВАНИЕ СУБСТРАТНЫХ СВОЙСТВ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ dU И dC С ПОМОЩЬЮ РЕАКЦИИ УДЛИНЕНИЯ ПРАЙМЕРА (РЕХ) И ПЦР

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

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

Нуклеиновые кислоты (НК), являясь хранителями генетической информации, способны проявлять свойства моноклональных антител (аптамеры), катализировать реакции (рибозимы и дезоксирибозимы) и действовать как молекулярные переключатели (аптазимы). Включение модифицированных нуклеотидов в цепь НК позволяет повысить их разнообразие, изменить физико-химические свойства модифицированных аптамеров и аптазимов [1], что играет важную роль для их применения в медицинской диагностике и в качестве индивидуальных терапевтических средств. Одним из способов получения модифицированных НК является ферментативный. Главной проблемой в случае использования данного метода является субстратная совместимость модифицированных нуклеотидов с используемыми полимеразы.

Нами проведено изучение субстратных свойств производных dU и dC, имеющих модификации по C5 положению пиримидинового цикла (рис. 1). Проводили РЕХ и ПЦР при одновременном встраивании mod-dU и mod-dC в реакцию смесь с полным замещением природных dT и dC. Так же создавали пары dU+dC. В работе использовали ДНК-полимеразы Taq- и Vent (exo-). Для РЕХ использовали синтетические матрицы, которые содержали участки для включения 1, 2, 3 и 4 модифицированных нуклеотидов последовательно. Для ПЦР использовали фрагмент гена groV *Mycobacterium tuberculosis* [2].

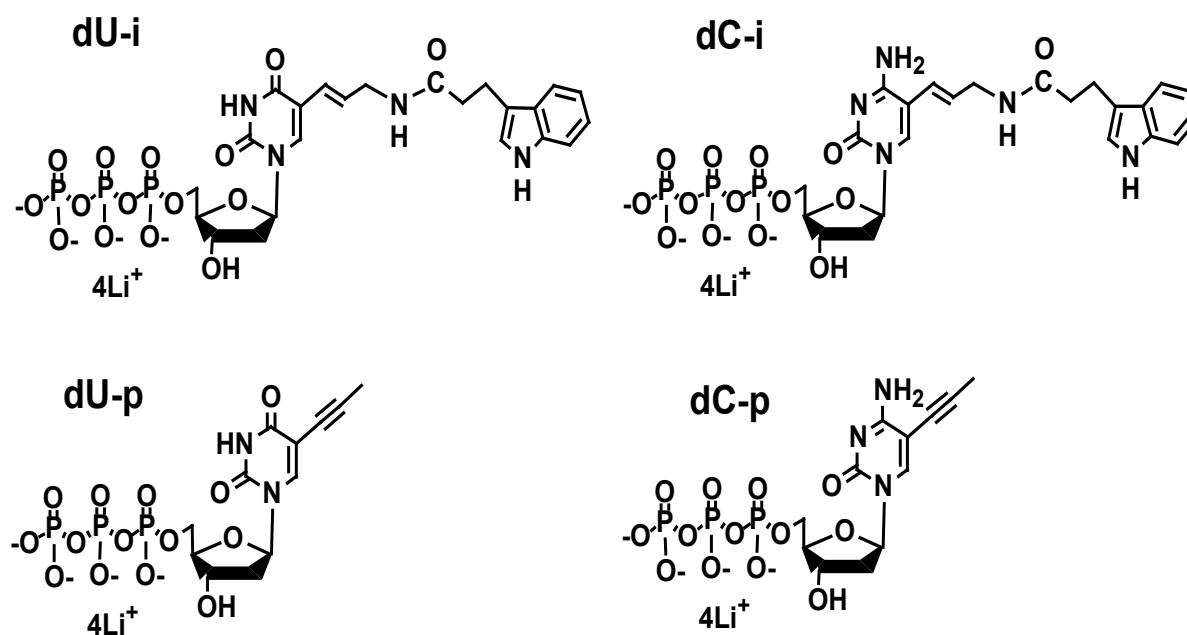


Рисунок 1. Модифицированные трифосфаты дезоксиуридина (слева) и дезоксицитидина (справа). dU-i и dC-i – производные, содержащие на пиримидиновых основаниях фрагменты 3-индолпропионовой кислоты, dU-p и dC-p – производные, содержащие на пиримидиновых основаниях 5-пропинил

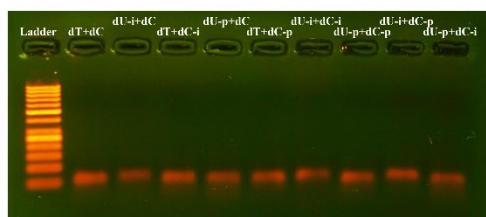
При проведении РЕХ с Taq-полимеразой лучшими субстратами оказались mod-dU (выход продукта около 30 %). В случае же использования mod-dC наблюдалась слабая субстратная совместимость, причем использование mod-dC с индольным заместителем приводило либо к получению неполноразмерных продуктов, либо к полному их отсутствию. Для mod-dC с 5-пропинил-производным выход продукта составил около 30 %. В парах dU+dC выход реакции не превышал 10 %.

При использовании Vent (exo-) – полимеразы полноразмерные продукты получали во всех случаях. Результаты РЕХ с Vent (exo-) – полимеразой приведены на рис. 2а.

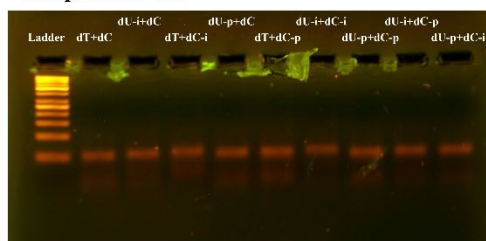
Тaq-полимераза в ПЦР проявила способность встраивать некоторые модифицированные dU, но mod-dC оказались для нее более сложными субстратами, что коррелирует с результатами РЕХ данного исследования, нашими предыдущими работами и литературными данными.

a) РЕХ

матрица M2UC

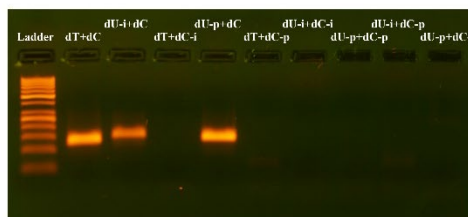


матрица M2CU



b) PCR

Тaq



Vent (exo-)

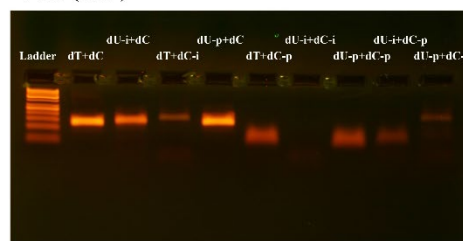


Рисунок 2. а). РЕХ с применением модельных матричных олигонуклеотидов M2UC и M2CU (длина 49 нт). На примере Vent (exo-) ДНК-полимеразы. Ladder – маркер длин продуктов GeneRuler 50bp; пары использованных dNTP указаны над соответствующими лунками геля. Сверху каждой фореграммы указана использованная синтетическая матрица б). ПЦР с применением бактериальной ДНК-матрицы. Сверху каждой фореграммы указана использованная полимеразы. Окрашивание бромистым этидием.

Использование Vent (exo-) – полимеразы в ПЦР позволило воспроизводимо получать полноразмерные продукты, одновременно содержащие mod-dU и mod-dC. Наиболее сложным субстратом оказался dC-i (индол-модифицированный), в комбинации с mod-dU получали большое количество неполноразмерных продуктов, но при индивидуальном применении удавалось получить полноразмерный продукт. Результаты ПЦР приведены на рис. 2б.

Таким образом, показано, что Vent (exo-) – полимеразы применима для проведения одновременного встраивания разноименных модифицированных трифосфатов дезоксирибонуклеозидов в растущую цепь ДНК. Изучение особенностей одновременного встраивания в растущую цепь ДНК разноименных модифицированных нуклеотидов способствует получению аптамеров и аптазимов нового поколения для применения в диагностике и терапии.

Исследование поддержано грантом РФФИ № 19-04-01217.

ЛИТЕРАТУРА

- Gawande B.N., Rohloff J.C., Carter J.D., von Carlowitz I., Zhang C., Schneider D.J., Janjic N. Selection of DNA aptamers with two modified bases // Proc. Natl. Acad. Sci. – 2017. – № 114. – с. 2898–2903.
 Mikhailovich V., Lapa S., Gryadunov D., Sobolev A., Strizhkov B., Chernyh N., Skotnikova O., Irtuganova O., Moroz A., Litvinov V., Vladimirovskii M., Perelman M., Chernousova L., Erokhin V., Zasedatelev A., Mirzabekov A. Identification of Rifampin-Resistant Mycobacterium Tuberculosis Strains by Hybridization, PCR, and Ligase Detection Reaction on Oligonucleotide Microchips // J. Clin. Microbiol. – 2001. – № 39. – с. 2531–2540.