



УСТРАНЕНИЕ МУЛЬТИМЕРИЗАЦИИ ДНК, ВОЗНИКАЮЩЕЙ ПРИ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ В ПРИСУТСТВИИ ДНК-ПОЛИМЕРАЗЫ Bst EHO-

© 2020 г. А. Р. Сахабутдинова*., Л. Р. Мирсаева*, И. П. Оскорбин**, М. Л. Филипенко**, Р. Р. Гарифутдинов*

*Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН,
Россия, 450054, Уфа, просп. Октября, 71

**Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Россия, 630090, Новосибирск, Новосибирская обл., пр. Академика Лаврентьева, 8

Поступила в редакцию 02.08.2019 г.

После доработки 06.09.2019 г.

Принята к публикации 10.09.2019 г.

В последние годы все большее распространение для обнаружения специфических нуклеотидных последовательностей приобретают методы изотермической амплификации нуклеиновых кислот, которые требуют использования полимераз с цепь-вытесняющей активностью. Среди подобных полимераз наиболее популярной является Bst eho-, однако она склонна к неспецифической амплификации – мультимеризации, приводящей к образованию продуктов, состоящих из тандемных нуклеотидных последовательностей. В данной работе оценена эффективность протекания мультимеризации в зависимости от условий проведения амплификации и предложены способы ее устранения. Обнаружено, что максимальная эффективность мультимеризации характерна для полимеразы Bst 2.0 в буфере Isothermal, а Bst-подобная полимеразы Gss обеспечивает образование продуктов мультимеризации только в буфере Isothermal и на поздних этапах реакции. Оптимальным способом устранения мультимеризации является использование: полимеразы Gss с буфером Thermpol, или полимеразы Bst LF с буфером Isothermal II, или полимеразы Bst 3.0 с буфером Thermpol, или полимеразы Bst 3.0 с буфером Isothermal и ионами Mn^{2+} в качестве кофактора. В перечисленных случаях возможна специфическая амплификация исследуемой ДНК-мишени и получение достоверного результата амплификации.

Ключевые слова: ДНК-полимераза Bst eho-, амплификация “катящимся кольцом” (АКК), мультимеризация, ДНК-полимераза Gss, специфичность

DOI: 10.31857/S0132342320010091

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время для обнаружения специфических нуклеотидных последовательностей все большее применение находят изотермические методы, такие как амплификация “катящимся кольцом” (АКК; rolling circle amplification, RCA) [1–3], “петлевая изотермическая амплификация” (loop mediated amplification, LAMP) [4, 5], метод NASBA (nucleic acid sequence based amplification) [6], амплификация смещением цепи (strand displacement amplification, SDA) [7] и другие [8–12]. Их несомненным преимуществом является возможность проведения реакций в порта-

тивных термостатирующих устройствах или в формате биосенсоров, то есть без использования дорогостоящих термоциклеров [13–16]. Реакции изотермической амплификации характеризуются в отдельных случаях более стабильной работой ферментов по сравнению с реакциями амплификации, протекающими при термоциклировании (например, полимеразная и лигазная цепные реакции) [2, 8, 9].

Проведение амплификации в изотермическом режиме требует использования полимераз с цепь-вытесняющей активностью (как правило, не имеют 5'→3'-экзонуклеазной активности), способных обеспечить эффективное расхождение цепей нуклеиновых кислот при постоянной температуре. К ним относятся, например, коммерческие ДНК-полимеразы Bst eho-, Bsu eho-, фрагмент Кленова, phi29, Vent eho- и другие. Полимераза Bst eho-, представляющая собой большой фраг-

Сокращения: АКК – амплификация “катящимся кольцом”; FAM – 5'-карбоксифлуоресцеин; DMTg – диметокситригильная группа; MC – кольцевые ДНК-матрицы; ML – линейные одноцепочечные ДНК-матрицы.

Автор для связи: (тел.: +7 (347) 235-60-88; факс: +7 (347) 235-60-88; эл. почта: sakhabutdinova.a.r@gmail.com).

мент ДНК-полимеразы I из *Geobacillus stearothermophilus*, используется наиболее часто ввиду сильной цепь-вытесняющей активности, относительной термостабильности (оптимум при 65°C) и высокой процессивности. Доступны несколько форм полимеразы Bst *exo*-: Bst LF (собственно Bst *exo*-), Bst 2.0, Bst 2.0 WarmStart, Bst 3.0. Описано также несколько Bst-подобных полимераз [17–19], в частности, Gss-полимераза и ее химерные формы, обладающие высокими процессивностью, точностью и стойкостью к ингибиторам [20, 21].

Однако полимеразы Bst *exo*- в изотермических условиях часто дает неспецифические продукты, которые могут нарабатываться даже в отсутствие матрицы и праймеров, т.е. путем *ab initio*-синтеза [22]. Было показано, что при амплификации короткой линейной матрицы и двух праймеров к ней происходит мультимеризация, заключающаяся в образовании набора ДНК-продуктов кратной длины – мультимеров, представляющих собой тандемно расположенные повторы нуклеотидной последовательности матрицы [23]. Их невозможно дифференцировать от продуктов амплификации “катящимся кольцом”, результатом которой также является набор ДНК кратной длины, называемых конкатемерами. Мультимеры и конкатемеры проявляются на электрофореграмме в виде лестницы полос, что затрудняет или делает невозможным интерпретацию результатов АКК, которая благодаря высокой чувствительности и универсальности стала на сегодняшний день мощным инструментом в биомедицинских и бионанотехнологических исследованиях [2, 3, 16, 24].

Недавно была предложена гипотеза, объясняющая мультимеризацию ДНК под действием полимеразы Bst *exo*- [25], согласно которой мультимеризация запускается за счет гибридизации одного из свободных 3'-концов двуцепочечного ампликона на комплементарной цепи с противоположной стороны дуплекса и последующей элонгации. Это приводит к появлению дополнительных сайтов отжига для праймеров, и далее амплификация удлиненных матриц обеспечивает экспоненциальное накопление мультимерных продуктов. Авторы не указывают причин, по которым происходит образование подобного инициаторного комплекса, поэтому детальный механизм мультимеризации до сих пор не ясен. Очевидно, что для повышения специфичности изотермической амплификации с полимеразой Bst *exo*- необходимо выявление условий, которые способствовали бы устранению мультимеризации, то есть подавляли бы образование неспецифических продуктов. Целью данной работы стал поиск факторов, устраняющих мультимеризацию ДНК под действием полимеразы Bst *exo*- или снижающих ее эффективность.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Поскольку точный механизм мультимеризации ДНК под действием полимеразы Bst *exo*- остается дискуссионным и требует дальнейшего изучения, важным является поиск условий, при которых мультимеризация была бы минимизирована. Без решения данной проблемы достоверность результатов, получаемых в реакции АКК, будет оставаться сомнительной. Ранее мы обнаружили, что краситель SYBR Green I, используемый для амплификации в режиме реального времени, ингибирующее действие которого в отношении ДНК-полимераз достаточно хорошо изучено [26], в определенном концентрационном диапазоне способен предотвратить образование мультимерных продуктов, практически не влияя при этом на амплификацию кольцевых матриц [27]. Однако использование ингибирующей концентрации указанного красителя в качестве единственного способа предотвращения мультимеризации может оказаться малоэффективным.

В настоящей работе на модельной молекулярной системе, состоящей из линейных одноцепочечных ДНК-матриц (ML) длиной 50 нт и праймеров F и R (табл. 1) к ним, было изучено влияние ряда условий на эффективность мультимеризации и осуществлен поиск способов ее устранения. В качестве положительного контроля протекания амплификации (специфическая амплификация) выступали образцы, содержащие кольцевые матрицы (MC), которые получали циклизацией (внутримолекулярным лигированием) ML на поддерживающих пробах S (табл. 1, рис. 1). В случае ML праймер R отжигается на 3'-конце матрицы и далее удлиняется полимеразой, давая короткий двуцепочечный продукт, при расхождении цепей которого возможен отжиг праймера F на синтезированной цепи. Для системы “линейная матрица-праймеры” в присутствии полимеразы Bst *exo*- происходит мультимеризация – неспецифическая амплификация ДНК, приводящая к образованию мультимеров (схема представлена ниже на рис. 3). В случае MC также происходит отжиг праймера R на части кольцевой ДНК, и в ходе его удлинения образуется длинный одноцепочечный продукт с многократно повторяющейся последовательностью, имеющей множество сайтов для отжига праймера F. В результате протекает АКК, приводящая к образованию конкатемеров. Мультимеры и конкатемеры проявляются на электрофореграмме в виде практически идентичных лестниц полос.

Амплификацию проводили в реальном времени при неингибирующей концентрации SYBR Green I (0.1×) с использованием ступенчатого температурного протокола. Поскольку праймеры, использованные в работе, имеют расчетную температуру отжига около 60°C, именно эта тем-

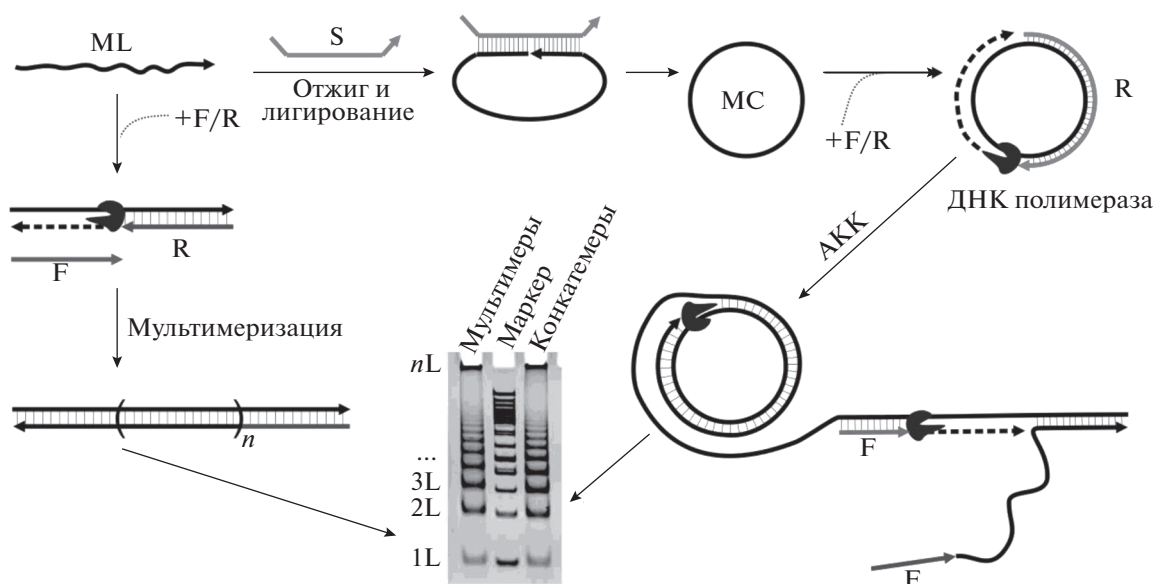


Рис. 1. Упрощенная схема получения кольцевых ДНК и изотермической амплификации линейных (ML) и кольцевых (MC) матриц. F/R – праймеры, S – поддерживающая проба, nL – размеры продуктов ампликации.

пература задавалась в качестве рабочей. Дополнительно задавали температуру начальной денатурации (70°C) для разрушения возможных димеров праймеров. Более высокую температуру не задавали, поскольку Bst-полимераза инактивируется при 80°C в течение 10 мин. Во всех опытах параллельно ставили образцы, содержащие линейные или кольцевые матрицы.

В экспериментах с полимеразой Bst exo- мы заметили, что при варьировании ряда параметров мультимеризация протекает с разной эффектив-

ностью. По-видимому, непосредственный старт мультимеризации является случайным и очень редким событием, вероятность возникновения которого зависит от условий проведения реакции. Интересным оказалось то, что максимальная эффективность мультимеризации наблюдалась для свежих фасовок полимеразы, а затем по мере работы происходило ослабление нежелательной активности фермента при сохранении специфической активности. Учитывая данное обстоятельство, все эксперименты проводились с

Таблица 1. Олигонуклеотиды, использованные в работе

| Название | Последовательность, 5'→3' | Длина, нт |
|----------|---|-----------|
| ML1 | ACTGTCAGTCCTGTAGTGCTCAGTGTCTCGTCGTACAGCCTACATTGTCAGT | 50 |
| F1 | ACTGTCAGTCCTGTAGTGCTCAGTG | 25 |
| R1 | ACTGACAATGTAGGCTGTACGACGA | 25 |
| ML1B | DMTr-ACTGTCAGTCCTGTAGTGCTCAGTGTCTCGTCGTACAGCCTACATTGTCAGT-FAM | 50 |
| F1B | DMTr-ACTGTCAGTCCTGTAGTGCTCAGTG | 25 |
| R1B | DMTr-ACTGACAATGTAGGCTGTACGACGA | 25 |
| ML2 | CCCGTCCGTCCTGTAGTGCTCAGTGTCTCGTCGTACAGCCTACACTGCCCCGC | 50 |
| F2 | CCCGTCCGTCCTGTAGTGCTCAGTG | 25 |
| R2 | GCGGGCAGTGTAGGCTGTACGACGA | 25 |
| ML3 | ACTTTCAGTCCTGTAGTGCTCAGGGCCCTCGTACAGCCTACATTGTTAGT | 50 |
| F3 | ACTTTCAGTCCTGTAGTGCTCAGGG | 25 |
| R3 | ACTAACAATGTAGGCTGTACGAGGG | 25 |
| S1 | GGACTGACAGTACTGACAATGT | 22 |
| S2 | ACGGACGGGGCGGGCAGT | 18 |
| S3 | CAGGACTGAAAGTACTAACAATGTAG | 26 |

Таблица 2. Среднее значение порогового времени T_t (мин) при изотермической амплификации линейной (ML1) и кольцевой (MC1) матриц в системах “полимераза-буфер”

| Буфер* | Матрица | Полимераза | | | |
|---------------|---------|-------------|-------------------------------|-------------|-------------|
| | | Bst LF | Bst 2.0/ Bst 2.0 WarmStart | Bst 3.0 | Gss |
| Thermopol | ML1 | 83.7 ± 17.3 | 66.7 ± 11.7 | — | — |
| | MC1 | 26.8 ± 1.2 | 29.7 ± 0.9 | 55.0 ± 2.4 | 30.4 ± 0.8 |
| Isothermal | ML1 | 51.7 ± 12.5 | 45.5 ± 7.1 | 56.7 ± 13.5 | 110.8 ± 8.4 |
| | MC1 | 16.7 ± 1.2 | 15.5 ± 1.0 | 33.3 ± 1.7 | 25.1 ± 1.2 |
| Isothermal II | ML1 | — | 69.2 ± 14.2 | 74.5 ± 16.4 | — |
| | MC1 | 31.7 ± 2.4 | 27.0 ± 0.9 | 24.2 ± 1.2 | 31.7 ± 1.1 |

* Состав буферов: 20 мМ Tris-HCl (pH 8.8), 10 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 мМ MgSO_4 , 0.1% Tween 20 с добавлением 10 мМ KCl (Thermopol); 50 мМ KCl (Isothermal); 150 мМ KCl (Isothermal II).

препаратами полимераз, предварительно обработанными дитиотреитолом (ДТТ), который часто используется как компонент буферных растворов, повышающий/сохраняющий активность ферментов. Для этого непосредственно перед постановкой амплификационных экспериментов препарат полимеразы смешивался с равным объемом 20 мМ водного раствора ДТТ, и смесь выдерживалась 1 ч при 4°C.

Для выявления условий, обеспечивающих максимальную эффективность мультимеризации, мы сначала на простой матрице ML1 и праймерах F1 и R1 протестировали активность несколько полимераз: Bst LF, Bst 2.0, Bst 2.0 WarmStart и Bst 3.0, а также полимеразу Gss. Применение полимеразы Bst 2.0 WarmStart, активирующейся при температуре выше 45°C, рекомендуется производителем для снижения вероятности образования побочных продуктов. Gss-полимераза, описанная нами ранее [20, 21], представляет собой Bst-подобную ДНК-полимеразу с повышенной процессивностью и стойкостью к ингибиторам. Аналогично полимеразе Bst *exo*-, она обладает цепь-вытесняющей активностью с оптимумом при 65°C. Амплификацию проводили в буферах Thermopol (рекомендован для Bst LF), Isothermal (для Bst 2.0 и Bst 2.0 WS) и Isothermal II (для Bst 3.0) и находили значения порогового времени T_t (time-to-threshold), соответствующего началу фазы экспоненциального роста кривых амплификации (табл. 2).

Буферы Thermopol, Isothermal и Isothermal II имеют практически идентичный состав за исключением концентрации KCl, которая резко возрастает от 10 мМ в Thermopol до 150 мМ Isothermal II. Несмотря на это, все четыре полимеразы Bst *exo*-приводили к накоплению мультимерных продуктов за исключением двух вариантов сочетания полимераз и буферов — Bst LF в буфере Isothermal II и Bst 3.0 в буфере Thermopol. Максимальная скорость накопления продуктов амплификации в большинстве случаев наблюдалась при проведе-

нии реакций в буфере Isothermal, который за счет KCl (50 мМ) создает, очевидно, наиболее оптимальные условия для проявления полимеразой Bst *exo*- своей полимеразной активности. Это, в свою очередь, обуславливает повышенную эффективность как специфической, так и неспецифической амплификации. Наибольшую склонность к мультимеризации показала полимеразы Bst 2.0 в буфере Isothermal, а наименьшую — полимеразы Gss, которая привела к позднему накоплению мультимерных продуктов исключительно в буфере Isothermal. Таким образом, избежать мультимеризации можно при использовании полимеразы Gss, или Bst LF совместно с буфером Isothermal II, или Bst 3.0 совместно с буфером Thermopol. В этих случаях возможна специфическая амплификация исследуемой ДНК-мишени и, соответственно, получение достоверного результата при проведении ДНК-диагностических процедур.

Следует отметить, что образцы, содержащие линейную матрицу, всегда имели значительный разброс в величине T_t (рис. 2а, кривые 4–6) в отличие от образцов с кольцевой матрицей (рис. 2а, кривые 1–3), что связано, очевидно, со случайным характером непосредственного старта мультимеризации. В отдельных случаях, например, при значительном различии в величинах T_t ($\Delta T_t = T_{t\text{лин}} - T_{t\text{кольц}}$) для опытных образцов и образцов отрицательного контроля (в нашем случае содержащих линейную матрицу), можно пренебречь протеканием неспецифической амплификации.

Однако гель-электрофоретический анализ все равно не позволяет дискриминировать продукты специфической и неспецифической амплификации, поскольку для обеих матриц наблюдается образование набора продуктов кратной длины (рис. 2б). Единственным признаком, неявно указывающим на мультимерный характер продуктов амплификации, является несоответствие длины

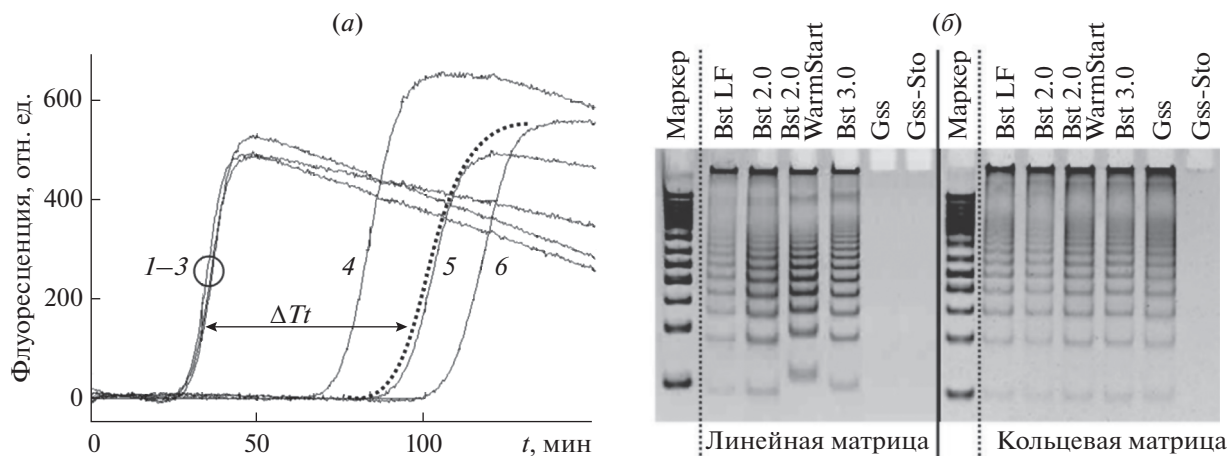


Рис. 2. Результаты изотермической амплификации линейной (ML1) и кольцевой (MC1) ДНК-матриц в присутствии полимеразы Bst LF. (а) Профили амплификации в буфере Thermopol для матрицы MC1 (кривые 1–3) и ML1 (4–6), 7 – условная кривая амплификации матрицы ML1 с усредненным значением T_i ; (б) электрофореграмма образцов после амплификации в разных буферах (маркер 50 bp DNA ladder, New England Biolabs).

мультимеров ожидаемым и варьирование длины для разных образцов.

Согласно предположению Ванга и сотр. [25], мультимеризация ДНК происходит за счет отжига на противоположной стороне дуплекса и последующей элонгации свободных 3'-концов двуцепочечного ампликона, что приводит к появлению дополнительных сайтов отжига для праймера и к экспоненциальному накоплению мультимерных продуктов. Однако авторы использовали в своем исследовании наряду с олигонуклеотидной матрицей только один праймер и при анализе результатов мультимеризации методом гель-электрофореза наблюдали шмер. В нашей работе использовались два праймера, поэтому на гелях визуализировались дискретные продукты амплификации. Поскольку максимальная эффективность мультимеризации наблюдалась при использовании полимеразы Bst 2.0 и буфера Isothermal, все дальнейшие эксперименты были проведены в данной системе.

Гипотетическая схема мультимеризации для системы “линейная матрица-праймеры” представлена на рис. 3. На первом этапе происходит отжиг и удлинение праймера R, приводящее к образованию простого (мономерного) двуцепочечного продукта длиной $1L$. Затем, согласно работе [25], свободный 3'-конец одной из цепей дуплекса по какой-то причине отжигается на комплементарной цепи с противоположной стороны и удлиняется (этапы 2 и 3). Удлинение одной из цепей обеспечивает увеличение количества мест отжига праймера F (этап 4а), и после многократного повтора событий отжига и элонгации праймеров происходит накопление мультимерных продуктов длиной nL (этапы 5, ..., i).

Ключевым в представленной схеме является этап 2, когда генерируется инициаторный комплекс и запускается процесс мультимеризации. Если гипотеза, выдвинутая Вангом [25], верна, то образование инициаторного комплекса можно затруднить с помощью нескольких приемов. Одним из них является использование праймеров и матрицы, несущих объемные группы по 3'- и 5'-концам, которые потенциально могут стабилизировать концы дуплекса, препятствуя тем самым “дыханию” цепей, и вызывать стерические затруднения в работе полимеразы, как было показано в работе [28].

Мы синтезировали дополнительно матрицу ML1B и праймеры F1B и R1B, в которых по 5'-концам располагалась диметокситритильная группа (DMTr), а по 3'-концу ML1B – флуоресцентный краситель FAM (табл. 1). Обе группы имеют относительно большой размер, устойчивы к отщеплению в условиях ферментативных превращений, а синтез олигонуклеотидов с такими группами является рутинным. Амплификацию праймерами F1B и R1B проводили как для матрицы ML1B, так и для ML1, а также матрицы ML1B праймерами F1 и R1 в качестве сравнения (системы ML1B/F1B/R1B, ML1/F1B/R1B и ML1B/F1/R1). Оказалось, что введение объемных групп в праймеры действительно несколько затрудняет мультимеризацию, но не предотвращает ее (табл. 3).

Еще одним приемом, затрудняющим протекание мультимеризации, может быть использование GC-богатых по 5'-концам праймеров. Такие праймеры, например с некомплементарными матрице 5'-концами, т.е. содержащими неспецифические нуклеотидные последовательности, могут быть легко сконструированы и использованы в амплификации любых ДНК-мишеней.

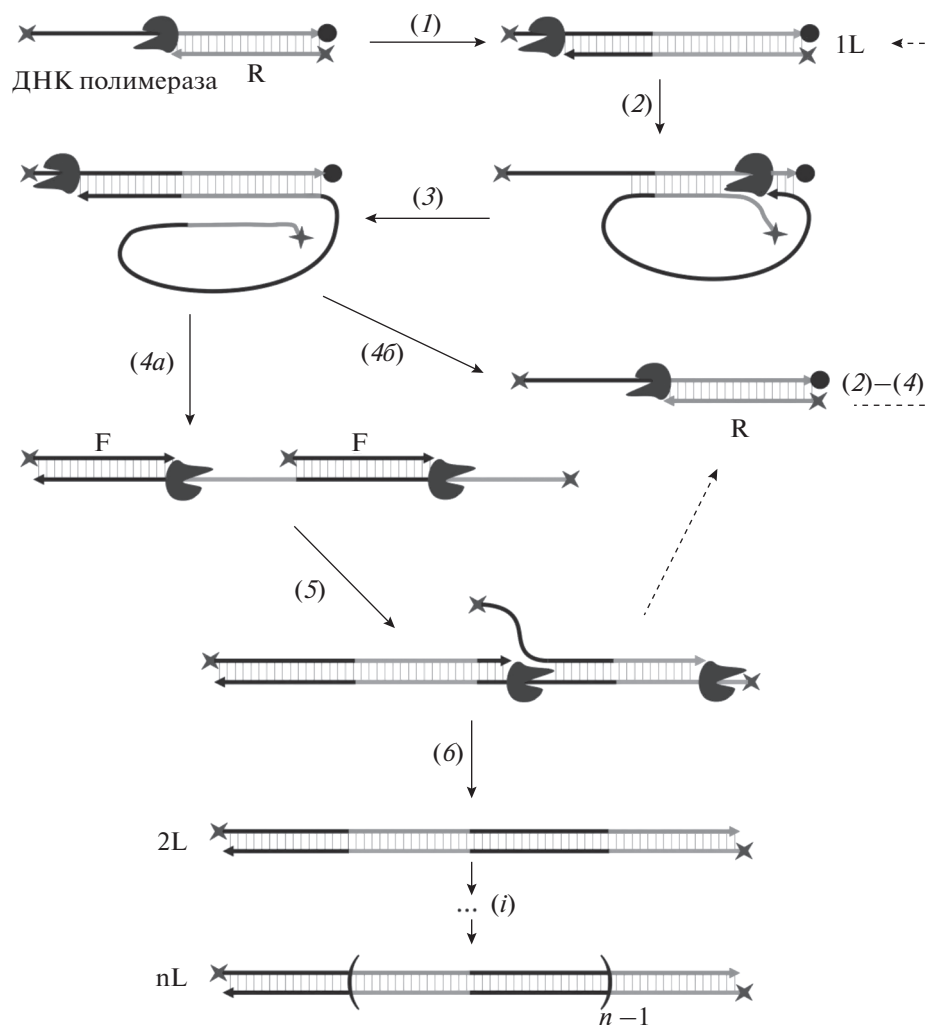


Рис. 3. Схема (этапы (1)–(6)) протекания мультимеризации при использовании олигонуклеотидных матриц и праймеров с объемными группами по концам (цепи черного цвета соответствуют участку праймера F, серого цвета – праймера R).

В этом случае за счет большей температуры денатурации GC-богатых участков эффективность “дыхания” концов двуцепочечного ампликона будет снижена, что снизит и вероятность образования инициаторного комплекса. Для проверки этого предположения нами были синтезированы матрица ML2 и пара праймеров F2/R2 к ней (табл. 1). Помимо набора ML2/F2/R2, была синтезирована матрица ML3 и пара праймеров F3/R3 с тремя нуклеотидами dG по их 3'-концам. Мы

предположили, что участок из шести нуклеотидов dG и dC в центре мономерного двуцепочечного ампликона также будет способствовать стабильности дуплекса и снижать вероятность образования инициаторного комплекса. Как и в предыдущем случае, амплификация матриц ML2 и ML3 показала некоторое снижение эффективности мультимеризации (табл. 3, системы ML2/F2/R2 и ML3/F3/R3), но не полное ее устранение.

Таблица 3. Среднее значение порогового времени T_t (мин) при изотермической амплификации линейных и кольцевых матриц праймерами с объемными группами*

| Матрица | Молекулярная система* | | | | |
|---------|-----------------------|-------------|------------|-------------|------------|
| | ML1B/F1B/R1B | ML1/F1B/R1B | ML1B/F1/R1 | ML2/F2/R2 | ML3/F3/R3 |
| ML1 | 74.3 ± 19.4 | 51.7 ± 13.8 | 47.8 ± 9.4 | 67.2 ± 16.5 | 59.7 ± 9.2 |
| MC1 | – | 16.8 ± 1.4 | – | 18.1 ± 0.8 | 16.4 ± 1.1 |

* Компоненты систем см. табл. 1.

Таблица 4. Среднее значение порогового времени T_t (мин) при изотермической амплификации линейной и кольцевой матриц в системах “полимераза–буфер–кофактор”

| Буфер | Кофактор | Bst LF | | Bst 2.0/Bst 2.0 WarmStart | | Bst 3.0 | |
|-----------------|------------------|-------------|-------------|---------------------------|------------|-------------|-------------|
| | | ML1 | MC1 | ML1 | MC1 | ML1 | MC1 |
| Thermopol-C | Mg ²⁺ | 81.3 ± 15.4 | 28.3 ± 1.3 | 68.5 ± 10.9 | 26.7 ± 1.0 | – | 52.8 ± 1.7 |
| | Mn ²⁺ | – | – | – | – | – | 100.0 ± 4.1 |
| Isothermal-C | Mg ²⁺ | 53.6 ± 11.7 | 14.9 ± 1.3 | 44.6 ± 12.2 | 17.2 ± 2.3 | 55.3 ± 12.7 | 29.0 ± 3.1 |
| | Mn ²⁺ | – | 100.0 ± 1.5 | – | 93.3 ± 2.5 | – | 66.7 ± 2.0 |
| Isothermal II-C | Mg ²⁺ | – | 33.4 ± 0.8 | 59.9 ± 11.5 | 25.0 ± 1.8 | 70.7 ± 19.1 | 23.4 ± 1.3 |
| | Mn ²⁺ | – | – | – | 86.7 ± 3.7 | – | 83.3 ± 2.4 |

Мы также предположили, что устранение мультимеризации возможно путем изменения активности полимеразы, например при замене кофактора. Известно, что в качестве таковых у ДНК полимераз выступают преимущественно ионы Mg²⁺. Однако неоднократно сообщалось о способности полимераз использовать другие катионы, например Mn²⁺, при этом в отдельных случаях происходит изменение типов ферментативной активности [29–31]. Для проверки данного предположения нами были приготовлены буферные растворы Thermopol-C, Isothermal-C и Isothermal II-C, полностью соответствующие составу поставляемых вместе с использованными в работе полимеразми, но не содержащие солей магния. В качестве нетипичных кофакторов использовали Mn²⁺, Cd²⁺ и Co²⁺ в концентрации 2.5 мМ, для которых ранее была показана возможность активации полноразмерной Bst-полимеразы [32, 33]. Найденные после амплификации значения T_t приведены в табл. 4.

Согласно полученным результатам, среди трех нетипичных катионов в качестве кофактора полимеразы Bst *exo*⁻ может выступать только Mn²⁺. При этом мультимеризация в присутствии ионов Mn²⁺ не протекает ни в одном из вариантов сочетания буферов и полимераз, а АКК протекает в большинстве случаев, хотя и со значительно меньшей эффективностью, чем при использовании Mg²⁺. Специфическая амплификация с Mn²⁺ для всех четырех полимераз Bst *exo*⁻ наблюдалась в буфере Isothermal-C.

Таким образом, в работе показано, что в изотермических условиях коммерческие полимеразы Bst *exo*⁻ обеспечивают протекание неспецифической амплификации – мультимеризации, приводящей к накоплению мультимерных продуктов практически для всех вариантов сочетания полимераз (4 вида) и поставляемых с ними буферов. Максимальная эффективность мультимеризации наблюдалась при проведении амплификации в буфере Isothermal, который обуславливает наилучшие условия для проявления полимеразой Bst *exo*⁻ своей полимеразной активности. Наибольшую склонность к мультимеризации проде-

монстрировала полимеразы Bst 2.0 в буфере Isothermal, а Bst-подобная полимеразы Gss обеспечивает образование продуктов мультимеризации только в буфере Isothermal и на поздних этапах реакции. Эффективность мультимеризации может быть несколько снижена при использовании праймеров с GC-богатыми 5'-концевыми последовательностями, некомплементарными матрице, а также с объемными 5'-концевыми группами, такими как FAM или DMTr. Использование ионов Mn²⁺ в качестве кофактора полимеразы способно устранить мультимеризацию в большинстве случаев, однако при этом снижается эффективность и специфической амплификации. Оптимальным условием устранения мультимеризации представляется один из вариантов: 1) использование полимеразы Gss совместно с буфером Thermopol, 2) использование полимеразы Bst LF совместно с буфером Isothermal II или Bst 3.0 совместно с буфером Thermopol, 3) использование полимеразы Bst 3.0 совместно с буфером Isothermal и ионами Mn²⁺ в качестве кофактора. В перечисленных случаях возможна специфическая амплификация исследуемой ДНК мишени и, соответственно, получение максимально достоверного результата ДНК-диагностических процедур.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы следующие реактивы: ДНК-полимеразы Bst LF, Bst 2.0, Bst 2.0 WarmStart и Bst 3.0, буферы Thermopol, Isothermal и Isothermal II (New England Biolabs, США); экзонуклеаза I (Exo I), T4-полинуклеотидкиназа (Fermentas, Литва); T4-ДНК-лигаза, dNTP (СибЭнзим, Россия); дитиотреитол, акриламид, *N,N'*-метиленбисакриламид, Tris, персульфат аммония, динатриевая соль *N,N,N',N'*-этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA), *N,N,N',N'*-тетраметилэтилендиамин (AppliChem, Германия); SYBR Green I (Биотех-Индустрия, Россия); 5-(этилтио)-1*H*-тетразол, 2-цианоэтил-амидофосфиты (dA-CE, dC-CE, dG-CE, dT-CE), носители для синтеза олигонуклеотидов (dA-CPG, dC-CPG, dG-CPG, dT-CPG) (Glen Research, США); абсолютные ацетонитрил и тетрагидрофуран квалификации “для синтеза ДНК”

(Panreac, Испания). ДНК-полимераза Gss была получена как описано в работе [21]. Буферные растворы Thermopol-C (20 mM Tris-HCl (pH 8.8), 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10 mM KCl, 0.1% Triton X-100), Isothermal-C (20 mM Tris-HCl (pH 8.8), 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 50 mM KCl, 0.1% Tween 20) и Isothermal II-C (20 mM Tris-HCl (pH 8.8), 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 150 mM KCl, 0.1% Tween 20) были приготовлены в соответствии с составом оригинальных буферов Thermopol, Isothermal, Isothermal II (New England Biolabs, США), поставляемых вместе с соответствующими полимеразами, но без ионов Mg^{2+} . Растворы солей MgCl_2 , MnCl_2 , CoCl_2 и $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ добавляли непосредственно в реакционные смеси для амплификации в конечной концентрации катиона 2.5 mM. Для приготовления всех растворов использовали воду высшей категории качества (>18 МОм, Millipore, Франция), все растворы перед применением фильтровали через шприцевые насадки Chromafil Xtra PET-20/25 (Macherey-Nagel, Германия) с размером пор 0.2 мкм.

Олигонуклеотидные матрицы и праймеры конструировали с использованием онлайн-утилиты OligoAnalyzer (Integrated DNA Technologies, США) и проверены с помощью инструментов BLAST на отсутствие гомологии с известными нуклеотидными последовательностями, депонированными в базе данных GenBank на сайте NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Праймеры синтезировали на автоматическом ДНК-синтезаторе ASM-800 (Биоссет, Россия) амидофосфитным способом, их очистку проводили методом гелеэлектрофореза в 15% ПААГ. Концентрацию всех нуклеиновых кислот определяли по оптическому поглощению водного раствора при 260 нм на спектрофотометре BioSpec-Mini (Shimadzu, Япония) и выражали как число оптических единиц в 1 мл (ОЕ/мл). Последовательности олигонуклеотидов представлены в табл. 1.

Кольцевые матрицы МС1-МС3. Олигонуклеотиды МЛ1-МЛ3 сначала фосфорилировали с помощью Т4-полинуклеотидкиназы согласно протоколу производителя, а затем в приборе T100 (Bio-Rad Laboratories, США) проводили отжиг в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 1 пмоль МЛ1, 5 пмоль поддерживающей пробы S1 или S2, буфер Т4-ДНК-лигазы, плавно снижая температуру с 80 до 25°C в течение 1 ч. После окончания отжига добавляли 2 мкл 10 mM АТР и 5 ед. акт. Т4-ДНК-лигазы. Смесь инкубировали 18 ч при 8°C, далее инактивировали лигазу при 75°C в течение 15 мин. Затем к реакционной смеси добавляли 1 ед. акт. экзонуклеазы I и ее буфер, инкубировали 2 ч при 37°C и еще 1 ч при 45°C, после чего инактивировали фермент при 85°C в течение 15 мин. Кольцевую матрицу далее использовали для амплификации без дополнительной очистки, разбавляя водой до концентрации 10^7 молекул/мкл.

Амплификацию с детекцией результатов по конечной точке проводили в приборе T100 (Bio-Rad

Laboratories, США). Образцы готовили в ПЦР-боксе с рециркулятором UVC/T-M-AR (Biosan, Латвия), предварительно облучая рабочее пространство, автоматические дозаторы и пластиковую посуду ультрафиолетом в течение 20 мин. Образцы объемом 10 мкл содержали 10^7 копий мишени, 5 пмоль каждого из праймеров, 1 мкл смеси dNTP с концентрацией 2.5 mM, 3 ед. акт. ДНК-полимеразы и соответствующий полимеразный буфер.

Протокол амплификации состоял из следующих этапов: 1) “условная” денатурация при 70°C – 30 с; 2) “условный” отжиг при 65°C – 60 с; 3) элонгация при 60°C – 3 ч. Амплификацию в режиме реального времени проводили в приборе iQ5 (Bio-Rad Laboratories, США). В данном случае реакционные смеси содержали дополнительно интеркалирующий краситель SYBR Green I (0.1×2^x), а каждый образец был представлен в трех повторах. В экспериментах с преобработкой полимеразы дитиотреитолом смешивали реагент с 20 mM водным раствором DTT в соотношении 1 : 1 и выдерживали 1 ч при 4°C, далее вносили в реакционные смеси для амплификации в объеме, содержащем равное количество единиц активности фермента, при этом концентрация DTT в реакционной смеси составляла 0.6 mM.

Электрофорез продуктов амплификации проводили в 10–15% полиакриламидных гелях в Трис-ацетатном буфере в камере вертикального типа VE-10 (Хеликон, Россия) при напряжении 90–110 В. Источником питания служил прибор Эльф-4 (ДНК-Технология, Россия). Гели окрашивали бромистым этидием и визуализировали в приборе Gel Camera System (UVP Inc., США).

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена на оборудовании Центра коллективного пользования “Биомика” и уникальной научной установки “КОДИНК”.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках государственного задания (тема № АААА-А16-116020350032-1).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fire A., Xu S.Q. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995. V. 92. P. 4641–4645.

2. Ali M.M., Li F., Zhang Zh., Zhang K., Kang D.K., Ankrum J.A., Le X.C., Zhao W. // *Chem. Soc. Rev.* 2014. V. 43. P. 3324–3341.
3. Mohsen M.G., Kool E.T. // *Acc. Chem. Res.* 2016. V. 49. P. 2540–2550.
4. Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., Hase T. // *Nucl. Acids Res.* 2000. V. 28. E63.
5. Wong Y.P., Othman S., Lau Y.L., Radu S., Chee H.Y. // *J. Appl. Microbiol.* 2018. V. 124. P. 626–643.
6. Compton J. // *Nature.* 1991. V. 350. P. 91–92.
7. Walter N.G., Strunk G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994. V. 91. P. 7937–7941.
8. Kim J., Easley C.J. // *Bioanalysis.* 2011. V. 3. P. 227–239.
9. Zhao Y., Chen F., Li Q., Wang L., Fan C. // *Chem. Rev.* 2015. V. 115. P. 12491–12545.
10. Fakruddin M., Mannan K. S., Chowdhury A., Mazumdar R.M., Hossain M. N., Islam S., Chowdhury M.A. // *J. Pharm. Bioallied Sci.* 2013. V. 5. P. 245–252.
11. Deng H., Gao Z. // *Anal. Chim. Acta.* 2015. V. 853. P. 30–45.
12. Mayboroda O., Katakis I., O'Sullivan C.K. // *Anal. Biochem.* 2018. V. 545. P. 20–30.
13. Giuffrida M.C., Spoto G. // *Biosens. Bioelectron.* 2017. V. 90. P. 174–186.
14. Qi H., Yue S., Bi S., Ding C., Song W. // *Biosens. Bioelectron.* 2018. V. 110. P. 207–217.
15. Cao H., Zhou X., Zeng Y. // *Sens. Actuator-B: Chem.* 2019. V. 279. P. 447–457.
16. Treeratrakoon K., Jiemsakul T., Tansarawiput C., Pinpradup P., Iempridee T., Luksirikul P., Khoothiam K., Dharakul T., Japrunng D. // *Anal. Biochem.* 2019. V. 577. P. 89–97.
17. Ma Y., Zhang B., Wang M., Ou Y., Wang J., Li S. // *Biomed. Res. Int.* 2016. 2906484.
18. Rastgoo N., Sadeghizadeh M., Bambaie B., Hosseinkhani S. // *J. Biotechnol.* 2009. V. 144. P. 245–252.
19. Çağlayan M., Bilgin N. // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2011. V. 165. P. 1188–200.
20. Oscorbin I.P., Belousova E.A., Boyarskikh U.A., Zakabunin A.I., Khrapov E.A., Filipenko M.L. // *Nucl. Acids Res.* 2017. V. 45. P. 9595–9610.
21. Oscorbin I.P., Boyarskikh U.A., Filipenko M.L. // *Mol. Biotechnol.* 2015. V. 57. P. 947–959.
22. Zyrina N.V., Antipova V.N., Zheleznyaya L.A. // *FEMS Microbiol. Lett.* 2014. V. 351. P. 1–6.
23. Hafner G.J., Yang I.C., Wolter L.C., Stafford M.R., Giffard P.M. // *BioTechniques.* 2001. V. 30. P. 852–867.
24. Gu L., Yan W., Liu L., Wang S., Zhang X., Lyu M. // *Pharmaceuticals.* 2018. V. 11. P. 35.
25. Wang G., Ding X., Hu J., Wu W., Sun J., Mu. Y. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. E13928.
26. Oscorbin I.P., Belousova E.A., Zakabunin A.I., Boyarskikh U.A., Filipenko M.L. // *Biotechniques.* 2016. V. 61. P. 20–25.
27. Гильванов А.Р., Сахабутдинова А.Р., Чемерис А.В., Гарафутдинов Р.Р. // *Биомика.* 2018. Т. 11. С. 268–273.
28. Güixens-Gallardo P., Hocek M., Perlíková P. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2016. V. 26. P. 288–291.
29. Hays H., Berdis A.J. // *Biochemistry.* 2002. V. 41. P. 4771–4778.
30. Frank E.G., Woodgate R. J. // *Biol. Chem.* 2007. V. 282. P. 24689–24696.
31. Xu W., Zhao W., Morehouse N., Tree M.O., Zhao L. // *J. Mol. Biol.* 2019. V. 431. P. 673–686.
32. Ralec C., Henry E. Lemor M., Killelea T., Henneke G. // *Nucl. Acids Res.* 2017. V. 45. P. 12425–12440.
33. Vashishtha A.K., Konigsberg W.H. // *Biochemistry.* 2018. V. 55. P. 2661–2670.

Elimination of DNA Multimerization Occurring at Isothermal Amplification with Bst exo- DNA Polymerase

A. R. Sakhabutdinova*^{*,#}, L. R. Mirsaeva*, I. P. Oscorbin^{*},
M. L. Filipenko**^{*}, and R. R. Garafutdinov***

[#]Phone/fax: +7 (347) 235-60-88; e-mail: sakhabutdinova.a.r@gmail.com

^{*}Institute of Biochemistry and Genetics UFRS RAS, prosp. Octyabrya 71, Ufa, 450054 Russia

^{**}Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS,
pr. Akademika Lavrent'eva 8, Novosibirsk, Novosibirskaya obl., 630090 Russia

Methods for isothermal amplification of nucleic acids have gained more attention in recent decades. For isothermal amplification, polymerases with strand-displacement activity are required, among which Bst exo- is the most popular polymerase. However, Bst exo- polymerase is able to nonspecific amplification (so-called multimerization) that leads to the accumulation of by-products consisting of tandem nucleotide repeats. In this study, the efficiency of multimerization depending on the reaction conditions was evaluated and methods for its elimination were proposed. The maximum efficiency of multimerization was found for Bst 2.0 polymerase in Isothermal buffer. In contrast, Bst-like Gss polymerase provides the multimerization products formation only in Isothermal buffer at the later stage of the reaction. The following methods for multimerization elimination are recommended: the use of Gss polymerase with Thermopol buffer, or Bst LF polymerase with Isothermal II buffer, or Bst 3.0 polymerase with Thermopol buffer, or Bst 3.0 polymerase with Isothermal buffer and Mn²⁺ ions as a cofactor. In these cases, specific isothermal amplification of nucleic acids is possible, which provides accurate and reliable results.

Keywords: Bst exo- DNA polymerase, rolling circle amplification (RCA), multimerization, Gss DNA polymerase, specificity