

Неспецифическая амплификация коротких одноцепочечных ДНК под действием ДНК полимеразы Bst

Гильванов Айдар Римович

Аспирант

Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, Уфа, Россия

E-mail: aidar_gilvanov@mail.ru

В последнее время широкое распространение получили методы изотермической амплификации ДНК, для проведения которой используются полимеразы с цепь-сдвигающей активностью: phi29, Bst exo^- , Vent exo^- и др. Наиболее часто применяется большой фрагмент ДНК полимеразы из *Geobacillus stearothermophilus* (Bst exo^-). Для нее нередко наблюдается образование неспецифичных продуктов даже в отсутствие матрицы и праймеров, но механизм данного явления до сих пор не ясен.

Нами изучено влияние ряда параметров на образование неспецифических продуктов при амплификации ДНК с помощью Bst exo^- по типу "клякшегося кольца" с двумя праймерами (вариант "раификация"). В ходе раификации образуются конкатемерные продукты, проявляющиеся на электрофореграмме в виде набора полос (лестницы) с длинами, кратными размеру исходной матрицы. Была смоделирована молекулярная система, состоящая из линейной или соответствующей ей кольцевой матрицы и двух праймеров. Варьированию подвергали тип матрицы (линейная или кольцевая, одно- или двуцепочечная), ее нуклеотидную последовательность, длину и количество копий, а также состав реакционной смеси, протоколы амплификации и способ детекции результата (в реальном времени и по конечной точке). При использовании кольцевых ДНК всегда получали характерную лестницу полос на электрофореграммах. В то же время аналогичная картина наблюдалась для некоторых вариантов молекулярной системы с использованием линейной одноцепочечной ДНК, т.е. протекала неспецифичная амплификация. Обнаружено, что она не происходит при малом количестве матрицы (менее 10^5 копий), при концентрации SYBR Green I выше $0,2\times$ от рекомендуемой, при использовании матрицы длиной более 60-70 нуклеотидов или двуцепочечной ДНК. Наибольшей склонностью к образованию неспецифичных продуктов обладает полимеразы Bst 2.0 в своем буфере. Секвенирование целевых продуктов раификации дало ожидаемый результат. В то же время, оказалось, что последовательность неспецифичных продуктов представляет собой прямые повторы последовательности исходной матрицы, но имеющие делеции по концам повторов. Требуется дальнейшие исследования для выяснения механизма неспецифичной амплификации ДНК в присутствии Bst полимеразы.