Вавиловский журнал генетики и селекции. 2022;26(1):5-13
DOI 10.18699/VJGB-22-02

Перевод на английский язык https://vavilov.elpub.ru/jour

Фосфорилгуанидиновые олигонуклеотиды как праймеры для РНК-зависимого ДНК синтеза с помощью обратной транскриптазы вируса лейкемии мышей

Е.С. Дюдеева, И.А. Пышная ✉

Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
✉ pyshnaya@niboch.nsc.ru

Аннотация. Современные подходы к обнаружению и анализу низкокопийных РНК часто основываются на использовании РНК-зависимых ДНК-полимераз, например, метод ОТ-ПЦР. Точность и эффективность синтеза кДНК в реакции обратной транскрипции (ОТ), катализируемой ревертазой (РНК-зависимой ДНК-полимеразой), значительно влияют на корректность результатов ПЦР-диагностики и/или секвенирования РНК. В связи с этим множество исследований посвящено оптимизации реакции ОТ, в том числе поиску более совершенных праймеров, необходимых для наработки полноразмерной ДНК-копии исследуемой РНК. Наиболее известные полностью незаряженные аналоги олигонуклеотидов – морфолиновые олигонуклеотиды и пептидонуклеиновые кислоты – не могут являться субстратами для ферментов, процессирующих НК. Целью нашей работы было пилотное исследование незаряженных фосфорилгуанидиновых олигодезоксирибонуклеотидов (ФГО) в качестве праймеров для обратной транскриптазы вируса лейкемии мышей (MMLV H-). Изучены особенности превращения частично и полностью незаряженных ФГО-праймеров. Продемонстрировано, что ФГО способны эффективно удлиняться, в том числе в присутствии фрагмента рРНК человека, обладающего сложной пространственной структурой. Доля абортивных продуктов удлинения ФГО-праймера зависит от ионной силы использованного буферного раствора, нуклеотидной последовательности праймера и наличия и расположения в его составе ФГ-групп. Полученные данные показывают возможность использования ФГО, включая полностью электронейтральные, как праймеров в реакциях ОТ-ПЦР, что открывает новые перспективы для создания систем анализа высокоструктурированных РНК.
Ключевые слова: незаряженные аналоги олигонуклеотидов; фосфорилгуанидиновые олигонуклеотиды; обратная транскрипция; ревертаза; обратная транскриптаза вируса лейкемии мышей; MMLV H-.

Для цитирования: Дюдеева Е.С., Пышная И.А. Фосфорилгуанидиновые олигонуклеотиды как праймеры для РНК-зависимого ДНК синтеза с помощью обратной транскриптазы вируса лейкемии мышей. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(1):5-13. DOI 10.18699/VJGB-22-02

Phosphoryl guanidine oligonucleotides as primers for RNA-dependent DNA synthesis using murine leukemia virus reverse transcriptase

E.S. Dyudeeva, I.A. Pyshnaya ✉

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia
✉ pyshnaya@niboch.nsc.ru

Abstract. Modern approaches to the detection and analysis of low-copy-number RNAs are often based on the use of RNA-dependent DNA polymerases, for example, in reverse-transcription PCR. The accuracy and efficiency of cDNA synthesis in the reverse-transcription reaction catalyzed by reverse transcriptase (RNA-dependent DNA polymerase) significantly affect the correctness of the results of PCR diagnostic assays and/or RNA sequencing. In this regard, many studies are focused on the optimization of the reverse-transcription reaction, including the search for more perfect primers necessary to obtain a full-length DNA copy of RNA under study. The best-known completely uncharged analogs of oligonucleotides – morpholine oligonucleotides and peptide nucleic acids – cannot be substrates for enzymes that process nucleic acids. The aim of this work was to conduct a pilot study of uncharged phosphoryl guanidine oligodeoxyribonucleotides (PGOs) as primers for mouse leukemia virus reverse transcriptase (MMLV H-). Specific features of elongation of partially and completely uncharged PGO primers were investigated. It was demonstrated that PGOs can be elongated efficiently, e.g., in the presence of a fragment of human ribosomal RNA having complex spatial structure. It was shown that the proportion (%) of abortive elongation products of a PGO primer depends on buffer ionic strength, nucleotide sequence of the

© Дюдеева Е.С., Пышная И.А., 2022
Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0

primer, and the presence and location of phosphoryl guanidine groups in the primer. The results indicate the suitability of PGOs, including completely electroneutral ones, as primers for reverse-transcription PCR, thereby opening up new prospects for the creation of experimental models for the analysis of highly structured RNA.
Key words: uncharged analogs of oligonucleotides; phosphoryl guanidine oligonucleotides; reverse transcription; reverse transcriptase; mouse leukemia virus reverse transcriptase; MMLV H-.

For citation: Dyudeeva E.S., Pyshnaya I.A. Phosphoryl guanidine oligonucleotides as primers for RNA-dependent DNA synthesis using murine leukemia virus reverse transcriptase. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(1):5-13. DOI 10.18699/VJGB-22-02

Введение

Обнаружение специфических РНК – одних из наиболее значимых природных биополимеров – является чрезвычайно актуальной задачей молекулярной диагностики, поскольку такие молекулы служат маркерами состояния клетки или организма в целом, его метаболического статуса или наличия инфекции. Быстрая и высокочувствительная детекция РНК может способствовать ранней диагностике и, как следствие, более эффективной терапии многих заболеваний. Наибольшей популярностью среди методов детекции РНК пользуется метод ОТ-ПЦР, заключающийся в двух последовательных этапах: ферментативный синтез кДНК по матрице РНК при помощи обратной транскриптазы (ревертазы) и наработка соответствующего фрагмента дцДНК с помощью стандартной полимеразной цепной реакции (ПЦР). В случае использования флуорофор-содержащих праймеров или зондов можно осуществить ПЦР в «реальном времени», сканируя нарастание сигнала флуоресценции, по которому достаточно точно вычисляется количество исследуемой РНК на клетку/образец. ОТ-ПЦР широко распространена при исследовании паттернов экспрессии мРНК (Bustin, 2000), этот метод применяют на этапе создания библиотек для высокопроизводительного секвенирования РНК (RNA-Seq) – одного из мощнейших инструментов для изучения транскриптомов и др. (Mortazavi et al., 2008; Haas, Zody, 2010).

Как правило, для проведения реакции ОТ используют обратную транскриптазу вируса лейкемии мышей Молони (MMLV). Данная ревертаза способна: катализировать синтез ДНК по матрице ДНК или РНК (Palikša et al., 2018; Li R. et al., 2020); осуществлять внематричный синтез коротких фрагментов ДНК (Ohtsubo et al., 2017); проводить синтез ДНК с вытеснением цепи (Kelleher, Champoux, 1998; Malik et al., 2017); осуществлять «смену» матричной цепи (Wulf et al., 2019); расщеплять РНК в составе гибридного РНК/ДНК комплекса (Schultz, Champoux, 2008; Li R. et al., 2020). В лабораторных исследованиях задействуют рекомбинантный вариант, лишенный активности РНКазы H (MMLV H-). Обширный пласт работ посвящен оптимизации реакции ОТ, в том числе поиску более эффективных праймеров на основе модифицированных олигонуклеотидов, обладающих повышенным сродством к комплементарным НК (Heuverswyn et al., 2016; Menéndez-Arias et al., 2016; Palikša et al., 2018; Li R. et al., 2020). Известные на сегодняшний день полностью незаряженные аналоги олигонуклеотидов – морфолиновые олигонуклеотиды и пептидонуклеиновые кислоты – не могут вступать в ферментативные реакции, вероятно, из-за чужеродного остова, значительно отличающегося по структуре от природного углеводофосфатного. Частично модифицированные Р-алкил-фосфонатные олигонуклеотиды и фосфорилгуанидиновые олигодезоксирибонуклеотиды (ФГО), в которых фрагмент рибозы остается неизменным, используют как праймеры для дискриминации «неправильного» комплекса в ходе ПЦР (Li T.-L. et al., 2019; Chubarov et al., 2020). В случае ФГО показано, что они образуют комплексы с комплементарной ДНК или РНК в растворах с пониженной ионной силой и даже в деионизованной воде, причем термическая стабильность этих комплексов сопоставима с таковой для нативного комплекса в условиях, близких к физиологическим (Kupryushkin et al., 2014; Dyudeeva et al., 2019). Более того, установлено, что пространственная структура дуплексов, содержащих ФГО, практически не отличается от структуры нативной двойной НК/НК спирали (Lomzov et al., 2019). Сочетание этих факторов делает ФГ-содержащие олигонуклеотиды перспективной платформой для разработки высокоспецифичных зондов и, возможно, допускает их участие в некоторых ферментативных превращениях НК, катализируемых как ревертазой, так и ДНК-зависимыми ДНК-полимеразами (Kupryushkin et al., 2017; Chubarov et al., 2020).

Целью данной работы было исследование влияния числа фосфорилгуанидиновых групп (ФГ-групп) и профиля модификации ими ДНК-праймера на возможность РНК-зависимого удлинения такого праймера с помощью ревертазы MMLV H-, анализ перспектив использования ФГО в качестве праймеров для ОТ-ПЦР при выявлении протяженных РНК.

Материалы и методы

Получение нуклеиновых кислот. Синтез нативных олигодезоксирибонуклеотидов и их ФГ-содержащих аналогов проводили в рамках фосфитамидного метода синтеза на автоматическом ДНК/РНК синтезаторе ASM-800 («Биоссет», Россия) с использованием коммерческих фосфитамидных мономеров и пористых полимерных носителей (GlenResearch, США). Для введения ФГ-групп применяли протокол, описанный в работе (Kupryushkin et al., 2014). Фрагмент 18S рРНК человека любезно предоставлен М.Р. Кабиловым (Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН).

Выделение олигонуклеотидов и их ФГ-аналогов из реакционной смеси осуществляли методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ) на хроматографе Agilent 1200 series (Agilent, США), используя колонку (4.6 × 150 мм) с сорбентом Eclipse XDB-C18 (5 мкм) (Agilent). Элюцию олигонуклео-

Таблица 1. Состав реакционных смесей для обратной транскрипции в случае короткой синтетической РНК-матрицы и протяженного фрагмента рРНК

17-звенная РНК-матрица		Фрагмент 18S рРНК	
Компонент	Количество	Компонент	Количество
ДНК	10^{-5} М	ДНК	10^{-6} М
РНК	10^{-5} М	РНК	10^{-6} М
MMLV H-	200 ед. акт.	MMLV H-	200 ед. акт.
dATP, dCTP, dGTP	300 мкМ каждого	dATP, dCTP, dGTP, dTTP	300 мкМ каждого
$dUTP^{FAM}$	50 мкМ	$dUTP^{FAM}$	–
Буферный раствор	1× St	Буферный раствор	1× St или L

тидов выполняли в линейном градиенте концентрации ацетонитрила (0–90 %) в 0.02 М растворе триэтиламмоний ацетата за 30 мин, скорость потока 1.5 мл/мин.

Электрофоретический анализ олигонуклеотидов и их ФГ-аналогов в денатурирующих условиях проводили в 15 % ПААГ (акриламид : N,N′-метиленбисакриламид (29:1), 8 М мочевина) в буфере TBE (89 мМ Tris-борат, pH 8.3, 2 мМ Na_2EDTA) при напряжении 50 В/см. Результаты электрофоретического разделения визуализировали окрашиванием геля реактивом StainsAll. При наличии флуорофора в составе олигонуклеотидов проводили сканирование флуоресценции при помощи системы гель-документирования VersaDoc MP 4000 Molecular Imager System (Bio-Rad, США).

Для разделения протяженных продуктов удлинения праймеров реакции ОТ использовали 1.5 % агарозный гель в буфере TBE в горизонтальной ячейке (Bio-Rad). Относительную электрофоретическую подвижность образцов оценивали с помощью двуцепочечного ДНК-маркера GeneRuler 100 bp DNA Ladder (ThermoScientific, Литва). Результаты электрофоретического разделения визуализировали, окрашивая гель бромистым этидием (0.0001 % водный раствор) и сканируя сигнал флуоресценции, как описано выше. Относительное содержание основных продуктов удлинения праймеров вычисляли, анализируя сканированный сигнал флуоресценции соответствующих пятен при помощи программного обеспечения GelPro Analyzer 4.0 (Media Cybernetics, США).

Реакции обратной транскрипции. Ферментативное удлинение олигонуклеотидов и их ФГ-аналогов в реакции ОТ проводили с рекомбинантным ферментом – обратной транскриптазой вируса лейкемии мышей MMLV H- («СибЭнзим», Россия). В качестве буферного раствора использовали следующие составы: стандартный (St) – 30 мМ Tris-HCl, 5 мМ $MgCl_2$, 50 мМ KCl, 5 мМ дитиотреит; низкосолевой (L) – 30 мМ Tris-HCl, 2 мМ $MgCl_2$, 5 мМ дитиотреит). Соотношение компонентов реакционной смеси ОТ приведено в табл. 1 (если не указано иное), суммарный объем смеси составил 10 мкл.

Реакцию ОТ проводили при 37 °С. Время реакции составило 1 ч в случае 17-звенной РНК-матрицы и 3 ч в случае высокомолекулярной РНК-матрицы – фрагмента 18S рРНК человека. По окончании реакции фермент инактивировали термически, выдерживая реакционную смесь при 95 °С в течение 5 мин, или гидролизовали РНК-матрицу, добавляя к реакционной смеси избыток концентрированного водного аммиака и выдерживая 2 ч при 56 °С. Аммиак удаляли, упаривая растворы в вакуумном концентраторе до исчезновения запаха.

Результаты и обсуждение

На первом этапе работы мы рассмотрели серию декамерных дезоксирибонуклеотидов, идентичных по нуклеотидной последовательности, но различающихся по числу введенных в их структуру незаряженных ФГ-групп (рис. 1) и их взаимному расположению (табл. 2).

Рассматриваемые деканулеотиды были комплементарны 3′-концевому участку модельной 18-звенной РНК-матрицы rM (рис. 2). Нуклеотидная последовательность матрицы в составе формируемого комплекса содержала в одноцепочечной части лишь одну позицию r<u>A</u>, напротив которой возможно встраивание в состав удлиняемой ДНК-цепи только одного флуоресцентного остатка $dUMP^{FAM}$ с помощью ДНК-зависимой РНК-полимеразы обратной транскриптазы вируса лейкемии мышей Молони (MMLV H-).

Первоначально был осуществлен поиск оптимальных условий реакции ОТ на примере нативного субстрата X/rM. Была проведена серия экспериментов, в которых варьировали: 1) температуру реакции, 2) количество фермента, 3) концентрацию трифосфатов, 4) концентрацию субстратного ДНК/РНК комплекса. Продукты реакции ОТ разделяли в 15 % полиакриламидном геле (ПААГ) и визуализировали, сканируя сигнал флуоресценции в канале FAM и затем окрашивая этот же гель реактивом StainsAll. Следует отметить, что окрашивание геля при помощи StainsAll позволяет контролировать материальный баланс каждой реакции, поскольку данный краситель «проявляет» все продукты элонгации, а также исходные матрицу и праймер. Флуоресцентный сигнал, в свою очередь, отражает накопление только целевых продуктов реакции ОТ, длина которых не менее 15 нуклеотидов, т. е. содержащих включенный остаток $dUMP^{FAM}$. Типичный результат анализа реакции ОТ приведен на рис. 3.

Видно, что увеличение концентрации флуоресцентного $dUTP^{FAM}$ при прочих равных условиях (см. рис. 3, дорожки *2* и *3*) не влияет на эффективность накопления продуктов элонгации нативного праймера в составе комплекса X/rM. Напротив, в случае повышения концентрации немеченых dNTP при постоянной концентрации

Таблица 2. Структура декануклеотидов

Обозначение	Последовательность 5′→3′	*n*
X	$G^oC^oG^oC^oC^oA^oA^oA^oC^oA$	0
$X_{1;4;7}$	$G^*C^oG^oC^*C^oA^oA^*A^oC^oA$	3
$X_{1;5;9}$	$G^*C^oG^oC^oC^*A^oA^oA^oC^*A$	3
$X_{2;4;6;8}$	$G^oC^*G^oC^*C^oA^*A^oA^*C^oA$	4
$X_{1–2;5–6;9}$	$G^*C^*G^oC^oC^*A^*A^oA^oC^*A$	5
$X_{1–2;5;8–9}$	$G^*C^*G^oC^oC^*A^oA^oA^*C^*A$	5
$X_{1;3;5;7;9}$	$G^*C^oG^*C^oC^*A^oA^*A^oC^*A$	5
$X_{1–3;7–9}$	$G^*C^*G^*C^oC^oA^oA^*A^*C^*A$	6
$X_{2–3;5–6;8–9}$	$G^oC^*G^*C^oC^*A^*A^oA^*C^*A$	6
$X_{1–9}$	$G^*C^*G^*C^*C^*A^*A^*A^*C^*A$	9

Примечание. «o» – нативная межнуклеотидная фосфатная группа; *n* – число ФГ-групп, обозначенных «*»; X – общее название серии 10-звенных олигонуклеотидов, нижний индекс – порядковый номер (с 5′-конца) модифицированных ФГ-групп. Все декануклеотиды были выделены и очищены унифицированным образом (см. Материалы и методы).

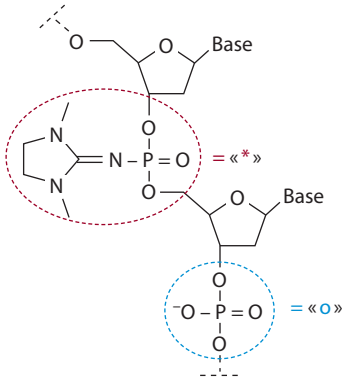

Рис. 1. Структуры модифицированной ФГ-группы (обозначено «*») и нативного фосфата (обозначено «o») в составе ДНК-цепи.

Base – азотистое основание.

Рис. 2. Схема удлинения декануклеотида серии X по РНК-матрице rM с образованием флуоресцентного продукта.

$dUTP^{FAM}$ (см. рис. 3, *А*, дорожки *3–5*) наблюдается снижение доли абортивных продуктов элонгации праймера и, как следствие, увеличение выхода флуоресцентного продукта элонгации. Максимальный выход полноразмерного продукта реакции (согласно сигналу флуоресценции на рис. 3, *Б*) при минимальном количестве абортивных продуктов элонгации наблюдается в дорожке *5*.

Именно такие условия были использованы в дальнейшем для сравнения эффективности реакции ОТ нативного и ФГ-содержащих праймеров, остов которых был частично или полностью лишен отрицательного заряда. На рис. 4 приведен результат электрофоретического анализа продуктов реакции ОТ, задействующих в качестве субстрата комплексы rM с каждым из декануклеотидов, которые представлены в табл. 2.

По данным окрашивания геля StainsAll (см. рис. 4, *А*), как и по данным сигнала флуоресценции (см. рис. 4, *Б*), можно утверждать, что происходит ферментативное удлинение всех олигонуклеотидов, включая полностью электронейтральный $X_{1–9}$. Отметим, что степень накопления полноразмерного флуоресцентного продукта несколько снижается при увеличении числа ФГ-групп в составе праймера (см. рис. 4, *Б*, дорожки *11–20*). Вероятно, это связано с нарушением электростатических взаимодействий внутри фермент-субстратного комплекса. Тем не менее полученные данные свидетельствуют о том, что незаря-

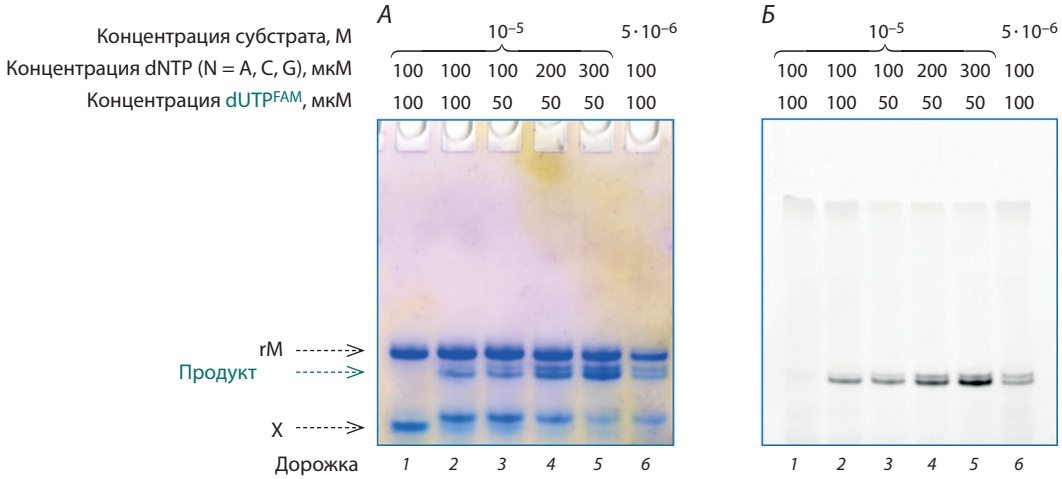

Рис. 3. Результат электрофоретического разделения продуктов реакций ОТ нативного субстрата X/rM при 37 °C и 200 ед. акт. фермента с различной концентрацией трифосфатов и ДНК/РНК субстрата в денатурирующем 15 % ПААГ после окрашивания реактивом StainsAll (*А*) и сканирования сигнала флуоресценции (*Б*).

Стрелками указаны матрица (rM), продукт реакции ОТ и нативный деканулеотид (X).

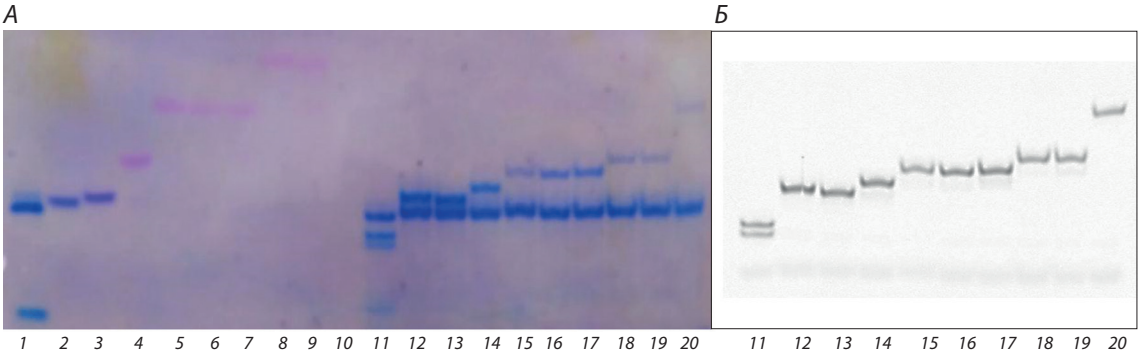

Рис. 4. Результат электрофоретического разделения продуктов реакций ОТ в денатурирующем 15 % ПААГ после окрашивания реактивом StainsAll (*А*) и сканирования сигнала флуоресценции (*Б*).

Дорожки *1–10* – контроли без фермента: смеси rM и праймера X (дор. *1*), индивидуальные праймеры $X_{1;4;7}$ (дор. *2*), $X_{1;5;9}$ (дор. *3*), $X_{2;4;6;8}$ (дор. *4*), $X_{1-2;5;8-9}$ (дор. *5*), $X_{1;3;5;7;9}$ (дор. *6*), $X_{1-2;5-6;9}$ (дор. *7*), $X_{1-3;7-9}$ (дор. *8*), $X_{2-3;5-6;8-9}$ (дор. *9*), X_{1-9} (дор. *10*); дорожки *11–20* – реакции ОТ с участием праймеров X (дор. *11*), $X_{1;4;7}$ (дор. *12*), $X_{1;5;9}$ (дор. *13*), $X_{2;4;6;8}$ (дор. *14*), $X_{1-2;5;8-9}$ (дор. *15*), $X_{1;3;5;7;9}$ (дор. *16*), $X_{1-2;5-6;9}$ (дор. *17*), $X_{1-3;7-9}$ (дор. 18), $X_{2-3;5-6;8-9}$ (дор. *19*), X_{1-9} (дор. *20*).

женные ФГО могут являться праймерами в реакции ОТ, что не было ранее описано для полностью модифицированных незаряженных аналогов олигонуклеотидов.

Детально проанализировать степень конверсии ФГО-праймеров в случае данной модельной системы не представлялось возможным (см. рис. 4, *А*, дорожки *2–10* и *11–20*), поскольку повышение степени модификации ФГО резко снижает эффективность их окрашивания с помощью НК-специфических красителей, например StainsAll (Dyudeeva et al., 2019). Учитывая это обстоятельство, для реализации следующего этапа работы были сконструированы нативные и ФГ-содержащие олигонуклеотиды, несущие на 5′-конце остаток флуорофора (табл. 3). Это позволило в дальнейшем детектировать весь спектр продуктов ферментативного превращения праймеров на протяженной матрице – фрагменте 18S рРНК человека. Структуры праймеров варьировали по степени модификации их углеводофосфатного остова относительно 3′-конца. Наряду с нативным праймерами (J1.o и J2.o) использовали их частично незаряженные аналоги, содержащие 5′-модифицированный и 3′-нативный остов с шестью немодифицированными фосфатными группами (J1.6 и J2.6) и тремя немодифицированными фосфатными группами (J1.3 и J2.3), а также полностью электронейтральные аналоги (J1.x и J2.x).

Нуклеотидные последовательности этих праймеров были комплементарны участкам фрагмента 18S рРНК человека (протяженность фрагмента 558 нуклеотидов) (рис. 5).

Первый из двух выбранных участков для гибридизации – J1-серия на рис. 5 – расположен ближе к 3′-концевой области фрагмента рРНК. В процессе ОТ с данного сайта возможно получить продукты, теоретическая длина которых должна составлять 439 нуклеотидов. Второй сайт связывания праймеров J2-серии находится ближе к середине фрагмента рРНК, теоретическая длина полноразмерных продуктов элонгации этого праймера составляет 276 нуклеотидов. При выборе сайтов связывания олигонуклеотидов со структурированными РНК-матрицами учитывали принципы, заложенные в работе (Petyuk et al., 1999).

Таблица 3. Структуры праймеров для реакции ОТ с участием высокомолекулярной РНК-матрицы, фрагмента 18S рРНК человека

Код	Последовательность 5′→3′
J1.o	[Flu]^{o}A^{o}T^{o}C^{o}G^{o}T^{o}T^{o}T^{o}A^{o}T^{o}G^{o}G^{o}T^{o}C^{o}G^{o}G^{o}A^{o}A^{o}C^{o}T^{o}A
J1.6	[Flu]^{o}A*T*C*G*T*T*T*A*T*G*G*T*C*G^{o}G^{o}A^{o}A^{o}C^{o}T^{o}A
J1.3	[Flu]^{o}A*T*C*G*T*T*T*A*T*G*G*T*C*G*G*A*A^{o}C^{o}T^{o}A
J1.x	[Flu]^{o}A*T*C*G*T*T*T*A*T*G*G*T*C*G*G*A*A*C*T*A
J2.o	[Flu]^{o}C^{o}C^{o}C^{o}T^{o}C^{o}T^{o}T^{o}A^{o}A^{o}T^{o}C^{o}A^{o}T^{o}G^{o}G^{o}C^{o}C^{o}T^{o}C^{o}A^{o}G^{o}T
J2.6	[Flu]^{o}C*C*C*T*C*T*T*A*A*T*C*A*T*G*G*C^{o}C^{o}T^{o}C^{o}A^{o}G^{o}T
J2.3	[Flu]^{o}C*C*C*T*C*T*T*A*A*T*C*A*T*G*G*C*C*T*C^{o}A^{o}G^{o}T
J2.x	[Flu]^{o}C*C*C*T*C*T*T*A*A*T*C*A*T*G*G*C*C*T*C*A*G*T

Примечание. «o» – нативная межнуклеотидная фосфатная группа; «*» – ФГ-группа; [Flu] – остаток флуоресцеина.

Как показано ранее, ФГО обладают способностью образовывать комплементарный комплекс в растворах с ультранизкой ионной силой (Kupryushkin et al., 2014; Dyudeeva et al., 2019), поэтому было принципиально сравнить эффективность протекания реакции ОТ для нативного и ФГ-содержащих праймеров в буферных растворах с различающейся ионной силой. Для этого из состава «стандартного» буферного раствора был полностью удален хлорид калия, а концентрация хлорида магния понижена с 5 до 2 мМ. Возможно, понижение ионной силы буферного раствора позволит дестабилизировать внутреннюю вторичную структуру РНК-матрицы и тем самым «облегчить» протекание реакции. Протяженные продукты удлинения праймеров анализировали методом гель-электрофореза в 1.5 % агарозном геле, детектируя их по сигналу флуоресценции и с помощью окрашивания геля бромистым этидием. Результат электрофоретического разделения продуктов реакции ОТ в буферных растворах со «стандартной» и пониженной ионной силой для праймеров серии J1 приведен на рис. 6. Видно, что введение

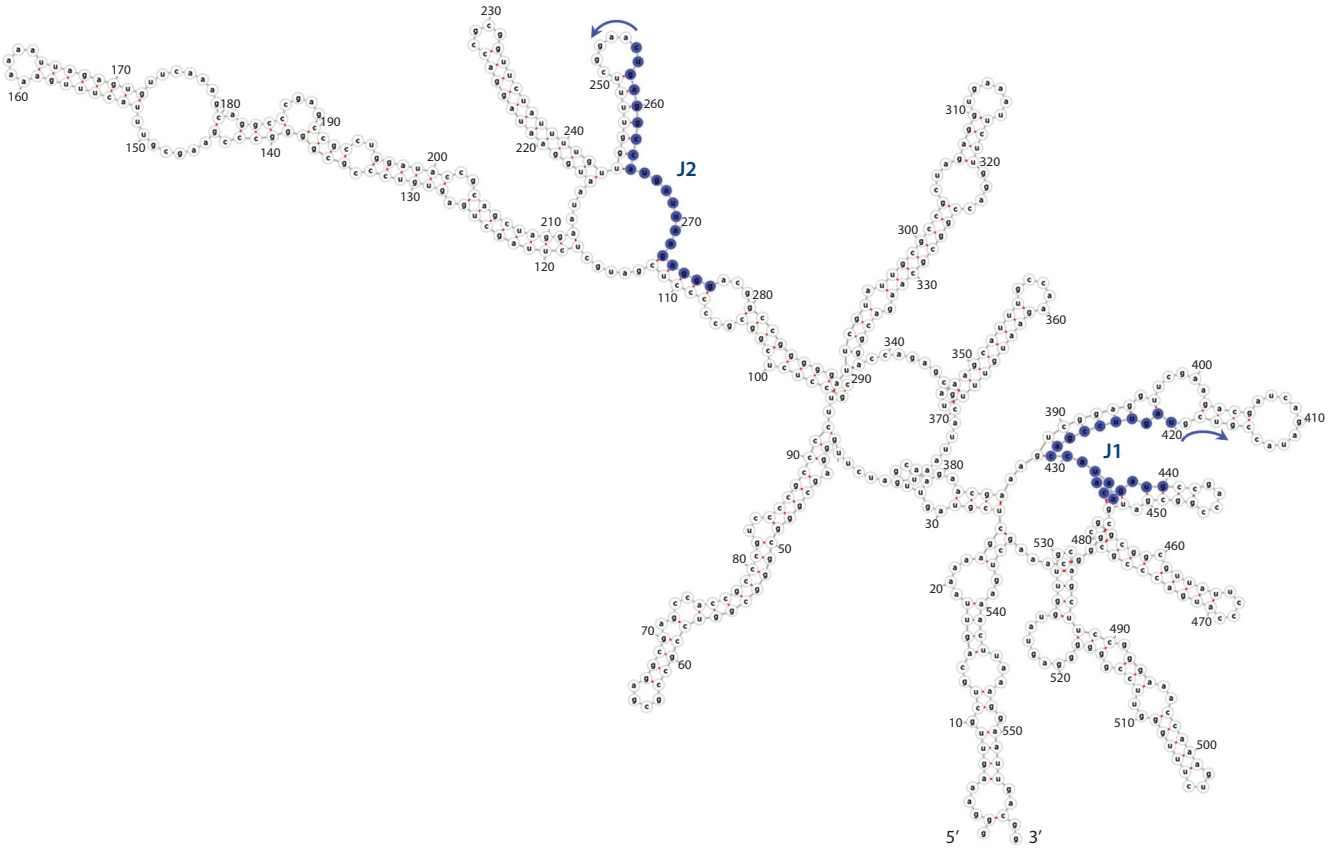

Рис. 5. Предполагаемая вторичная структура фрагмента 18S рРНК человека, построенная при помощи онлайн-сервиса RNAfold web server. J1 и J2 – сайты, выбранные для гибридизации праймеров. Стрелками показано направление удлинения праймеров.

ФГ-групп в состав праймера приводит к ожидаемому понижению его электрофоретической подвижности за счет уменьшения суммарного заряда молекулы (см. рис. 6, *А*, дорожки *1*, *4*, *7*, *10*). Ферментативная элонгация праймера наблюдается во всех случаях, даже для праймера J1.x, обладающего полностью электронейтральным углеводофосфатным остовом (см. рис. 6, *А*, дорожки *11*, *12*).

На примере нативного праймера J1.o рассмотрим общий вид реакционной смеси, полученной в результате ОТ (см. рис. 6, дорожки *1–3*). Исходный праймер J1.o (дорожка *1*) практически отсутствует среди продуктов его реакции ОТ (дорожки *2* и *3*), что свидетельствует об эффективном протекании реакции. Тем не менее продукты элонгации праймера достаточно разнородны по своей электрофоретической подвижности и, соответственно, длине: наблюдаются абортивные продукты элонгации. Вероятно, это связано с высокой степенью структурированности РНК-матрицы, поскольку ревертаза, не обладая хеликазной активностью, не способна преодолеть шпильки РНК или другие вторичные структуры, что может привести к диссоциации фермента и ДНК-РНК субстрата (Okano et al., 2017). Как следствие, снижается ожидаемая процессивность реакции ОТ. В рассматриваемых реакционных смесях (см. рис. 6, дорожки *2* и *3*) можно выделить два превалирующих продукта (***a*** и ***b***). Электрофоретическая подвижность продукта ***a*** сопоставима с подвижностью исходной РНК-матрицы (см. рис. 6, *Б*, дорожка *14*), длина которой 558 нуклеотидов, и с подвижностью полос в ДНК-маркере (дорожка *13*), соответствующим длинам 500 и 600 пар оснований. Можно полагать, что данный продукт по своей длине близок к полноразмерному теоретическому. Продукт ***b*** обладает меньшей электрофоретической подвижностью, приблизительно соответствующей подвижности 300 пар оснований в дцДНК-маркере. Даже введение дополнительной стадии денатурации рРНК при 95 °C для уменьшения вероятности ее структурирования не привело к увеличению выхода продукта ***a*** (данные не представлены).

Интересно, что электрофоретическая подвижность исходных праймеров J1.6, J1.3 и J1.x (см. рис. 6, *А*, дорожки *4*, *7*, *10*) ниже, чем у продуктов их удлинения в реакции ОТ (см. рис. 6, *А*, дорожки *5–6*, *8–9* и *11–12*). По всей видимости, на начальных этапах реакции включение очередного dNTP в растущую цепь модифицированного ФГО-праймера влечет за собой увеличение скорости миграции олигонуклеотида в геле за счет более заметного изменения заряда; размер молекулы при этом еще не изменился настолько значительно, чтобы вызвать задержку в порах агарозного геля. Однако при достижении некой критической длины, на более поздних этапах реакции, общий размер молекул оказывает большее влияние на скорость миграции в геле, нежели увеличение заряда при включении очередного dNTP. Таким образом, протяженные продукты реакции ОТ для ФГ-содержащих праймеров демонстрируют «классическое» поведение в геле, замедляясь при увеличении размера молекулы. Вклад

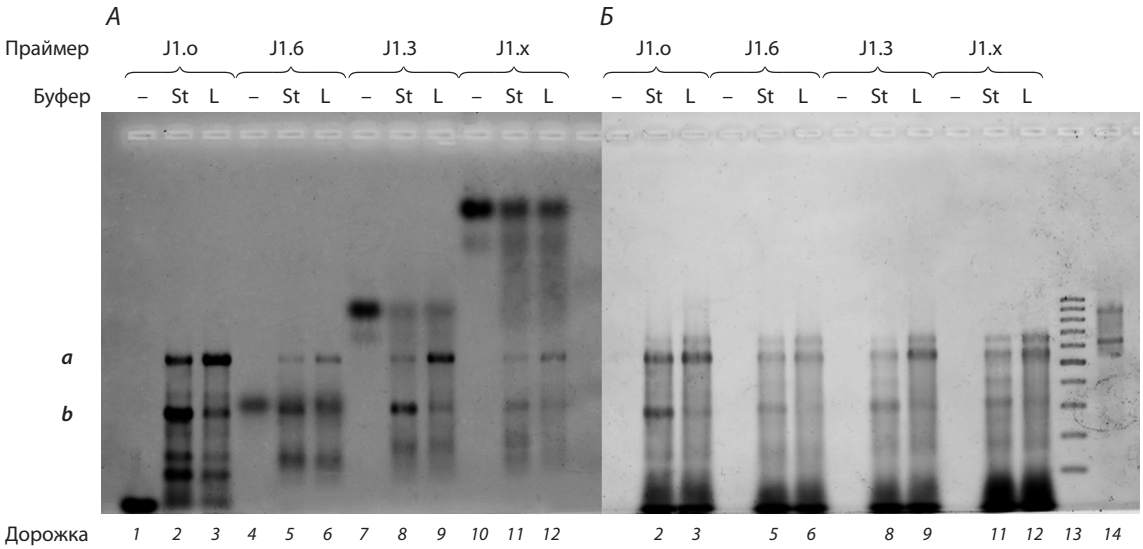

Рис. 6. Результат сканирования сигнала флуоресценции FAM (*А*) и бромистого этидия (*Б*) после разделения продуктов реакции ОТ в 1.5 % агарозном геле:

индивидуальных ДНК-праймеров J1.o (дор. *1*), J1.6 (дор. *4*), J1.3 (дор. *7*), J1.x (дор. *10*), которые видны только при сканировании флуоресценции FAM; продуктов реакции ОТ праймеров J1.o (дор. *2*), J1.6 (дор. *5*), J1.3 (дор. *8*), J1.x (дор. *11*) в «стандартных» буферных условиях (St); продуктов реакции ОТ праймеров J1.o (дор. *3*), J1.6 (дор. *6*), J1.3 (дор. *9*), J1.x (дор. *12*) в буфере с пониженной ионной силой (L); ДНК-маркера 100–1000 п. о. (дор. *13*), который виден только при сканировании флуоресценции бромистого этидия; РНК-матрицы (дор. *14*), которая видна только при сканировании флуоресценции бромистого этидия.
Тип праймера и буферных растворов указаны на рисунке, ***a*** и ***b*** соответствуют положениям превалирующих продуктов реакции ОТ.

относительно небольшого числа ФГ-групп в этом случае становится незначителен. Благодаря этому, вероятно, электрофоретическая подвижность наиболее представленных продуктов реакции ОТ (***a*** и ***b***) практически не зависит от числа модификаций в исходном ФГ-содержащем праймере.

Понижение ионной силы реакционного буфера (см. рис. 6, дорожки *3*, *6*, *9*, *12*) приводит к накоплению более длинных продуктов ***a*** реакции ОТ по сравнению со стандартными реакционными условиями (дорожки *2*, *5*, *8*, *11*), вне зависимости от наличия модификаций в составе праймера. Наиболее выраженно изменение ионной силы повлияло на соотношение продуктов элонгации нативного праймера J1.o: согласно интенсивностям сигнала флуоресценции, относительное содержание наиболее протяженного продукта ***a*** выросло втрое (с 9 до 27 %), в то время как содержание абортивного продукта ***b*** уменьшилось (с 26 до 10 %) при понижении ионной силы буферного раствора. Вероятно, удаление части солей из состава буфера позволило дестабилизировать внутреннюю структуру РНК, но не оказало значительного влияния на формирование тройного комплекса «ДНК–РНК–фермент». Для модифицированных ФГ-содержащих праймеров перераспределение продуктов элонгации при смене буферного раствора тоже наблюдалось, но на уровне нескольких процентов.

Следует отметить, что для полностью электронейтрального ФГО J1.x (см. рис. 6, *А*, дорожки *10–12*) мы наблюдали меньшую конверсию в реакции ОТ относительно нативного праймера (дорожки *1–3*). Можно предположить, что лимитирующая стадия реакции ОТ для полностью электронейтрального ФГО J1.x – присоединение первых dNMP к 3′-концу полностью электронейтрального праймера (по аналогии с работой (Skasko et al., 2005)). Затем фермент полностью переключается на «предпочтительный» субстрат, содержащий на 3′-конце нативные немодифицированные нуклеотиды, «не замечая» пусть даже избыточного количества исходного праймера.

Аналогичные результаты были получены для праймеров серии J2 (рис. 7). В данном случае среди продуктов удлинения праймера наблюдается меньшее количество абортивных продуктов. Вероятнее всего, это связано с тем, что теоретическая максимальная длина продуктов элонгации меньше, чем в случае праймера J1, и в ходе элонгации преодолевается меньшее количество шпилек или других структурных элементов РНК-матрицы, из-за чего процессивность работы фермента оказывается выше.

Основной продукт элонгации праймеров серии J2 обладает электрофоретической подвижностью, сопоставимой с двуцепочечным ДНК-маркером длиной 400 пар оснований. Предположительно, этот продукт близок по длине к полноразмерному (276 нуклеотидов для данного праймера). Его относительное содержание в реакционных смесях представлено на рис. 8. Как и для праймеров серии J1, мы наблюдали более эффективное накопление целевого продукта в буферном растворе с пониженной ионной силой (L) для нативного праймера J2.o (увеличение доли основного продукта с 45 до 61 %) и для ФГ-праймера J2.3 (с 33 до 46 %).

Интересно, что другие ФГ-праймеры оказались практически индифферентны к изменению ионной силы. Возможно, расположение ФГ-групп в активном центре фермента оказывает влияние на конформацию фермент-субстратного комплекса и, как следствие, на его чувствительность к ионному составу среды и сольватации.

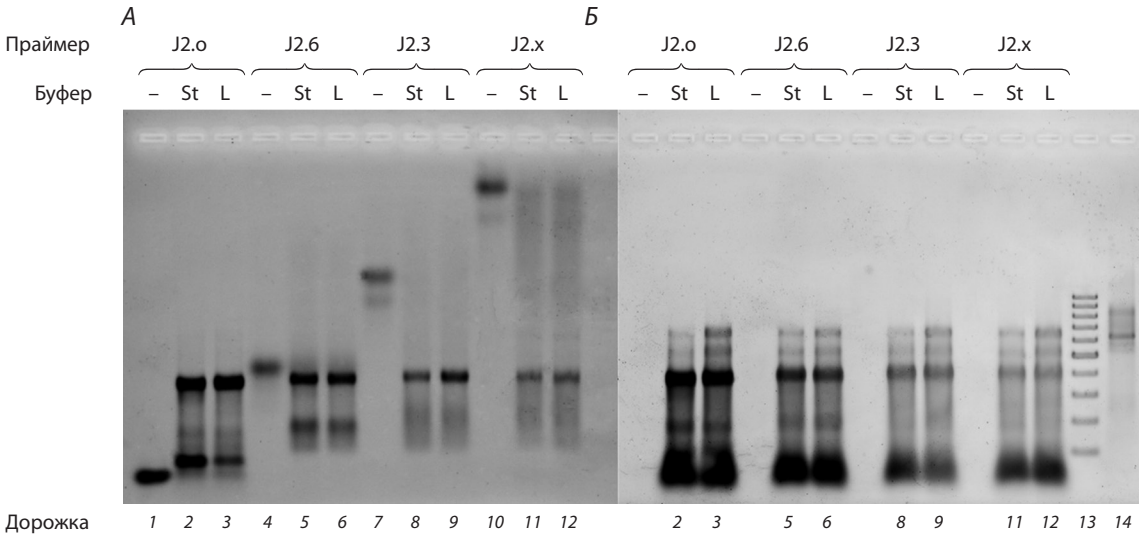

Рис. 7. Результат сканирования сигнала флуоресценции FAM (*А*) и бромистого этидия (*Б*) после разделения продуктов реакции ОТ в 1.5 % агарозном геле:

индивидуальных ДНК-праймеров J2.o (дор. *1*), J2.6 (дор. *4*), J2.3 (дор. *7*), J2.x (дор. *10*), которые видны только при сканировании флуоресценции FAM; продуктов реакции ОТ праймеров J2.o (дор. *2*), J2.6 (дор. *5*), J2.3 (дор. *8*), J2.x (дор. *11*) в «стандартных» буферных условиях (St); продуктов реакции ОТ праймеров J2.o (дор. *3*), J2.6 (дор. *6*), J2.3 (дор. *9*), J2.x (дор. *12*) в буфере с пониженной ионной силой (L); ДНК-маркера 100–1000 п. о. (дор. *13*), который виден только при сканировании флуоресценции бромистого этидия; РНК-матрицы (дор. *14*), которая видна только при сканировании флуоресценции бромистого этидия.
Тип праймера и буферных растворов указаны на рисунке.

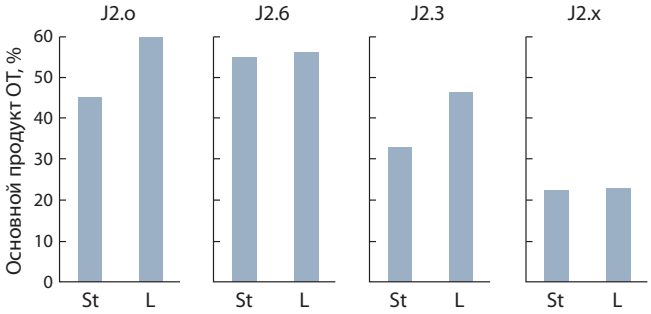

Рис. 8. Относительное содержание основного продукта элонгации праймеров серии J2, образующегося в результате реакции ОТ в растворе со «стандартной» (St) и пониженной (L) ионной силой.

Заключение

Таким образом, нами изучены особенности удлинения частично и полностью не заряженных фосфорилгуанидиновых олигодезоксирибонуклеотидов (ФГО) в реакции обратной транскрипции с помощью ревертазы MMLV H-. Продемонстрировано, что ФГ-содержащие праймеры способны эффективно удлиняться, в том числе в присутствии фрагмента рРНК человека, обладающего сложной пространственной структурой. Снижение ионной силы буферного раствора позволяет повысить эффективность синтеза полноразмерной кДНК при использовании как нативных, так и ФГ-содержащих праймеров. Полученные данные показывают возможность применения ФГО, включая полностью электронейтральные, как праймеров в реакциях ОТ-ПЦР, что открывает новые перспективы для создания систем анализа высокоструктурированных РНК и требует дальнейших исследований.

Список литературы / References

Bustin S.A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* 2000;25(2):169-193. DOI 10.1677/jme.0.0250169.

Chubarov A.S., Oscorbin I.P., Filipenko M.L., Lomzov A.A., Pyshnyi D.V. Allele-specific PCR for *KRAS* mutation detection using phosphoryl guanidine modified primers. *Diagnostics* (*Basel*). 2020; 10(11):872. DOI 10.3390/diagnostics10110872.

Dyudeeva E.S., Kupryushkin M.S., Lomzov A.A., Pyshnaya I.A., Pyshnyi D.V. Physicochemical properties of the phosphoryl guanidine oligodeoxyribonucleotide analogs. *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2019;45(6):709-718. DOI 10.1134/S1068162019060153.

Haas B.J., Zody M.C. Advancing RNA-Seq analysis. *Nat. Biotechnol.* 2010;28(5):421-423. DOI 10.1038/nbt0510-421.

Heuverswyn F.V., Karczmarczyk M., Schimmel H., Trapmann S., Emons H. Influence of primer & probe chemistry and amplification target on reverse transcription digital PCR quantification of viral RNA. *Biomol. Detect. Quantif.* 2016;9:20-28. DOI 10.1016/j.bdq.2016.08.003.

Kelleher C.D., Champoux J.J. Characterization of RNA strand displacement synthesis by Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase. *J. Biol. Chem.* 1998;273(16):9976-9986. DOI 10.1074/jbc.273.16.9976.

Kupryushkin M.S., Pyshnaya I.A., Dmitrienko E.V., Stetsenko D.A., Filipenko M.L., Oscorbin I.P., Stepanov G.A., Richter V.A., Ivanov M.K., Pyshnyi D.V. Template-directed enzymatic DNA synthesis using phosphoryl guanidine oligonucleotides. 2017. Publication Number WO/2019/112485. Appl. Date 17.09.2018. Publ. Date 13.06.2019.

Kupryushkin M.S., Pyshnyi D.V., Stetsenko D.A. Phosphoryl guanidines: a new type of nucleic acid analogues. *Acta Naturae.* 2014; 6(4):116-118.

Li R., Wu R., Li H., Zhang Y., Peng D., Wang N., Shen X., Wang Z., Sun H. Characterizing stutter variants in forensic STRs with massively parallel sequencing. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2020;45: 102225. DOI 10.1016/j.fsigen.2019.102225.

Li T.-L., Wu M.-W., Lin W.-C., Lai C.-H., Chang Y.-H., Su L.-J., Chen W.-Y. Designed phosphate-methylated oligonucleotides as PCR primers for SNP discrimination. *Anal. Bioanal. Chem.* 2019; 411:3871-3880. DOI 10.1007/s00216-019-01865-4.

Lomzov A.A., Kupryushkin M.S., Shernyukov A.V., Nekrasov M.D., Dovydenko I.S., Stetsenko D.A., Pyshnyi D.V. Diastereomers of a mono-substituted phosphoryl guanidine trideoxyribonucleotide: isolation and properties. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2019; 513(4):807-811. DOI 10.1016/j.bbrc.2019.04.024.

Malik O., Khamis H., Rudnizky S., Kaplan A. The mechano-chemistry of a monomeric reverse transcriptase. *Nucleic Acids Res.* 2017; 45(22):12954-12962. DOI 10.1093/nar/gkx1168.

Menéndez-Arias L., Sebastián-Martín A., Álvarez M. Viral reverse transcriptases. *Virus Res.* 2016;234:153-176. DOI 10.1016/j.virusres.2016.12.019.

Mortazavi A., Williams B.A., McCue K., Schaeffer L., Wold B. Mapping and quantifying mammalian transcriptome by RNA-Seq. *Nat. Methods.* 2008;5(7):621-628. DOI 10.1038/nmeth.1226.

Ohtsubo Y., Nagata Y., Tsuda M. Efficient N-tailing of blunt DNA ends by Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase. *Sci. Rep.* 2017;7:41759. DOI 10.1038/srep41769.

Okano H., Katano Y., Baba M., Fujiwara A., Hidese R., Fujiwara S., Yanagihara I., Hayashi T., Kojima K., Takita T., Yasukawa K. Enhanced detection of RNA by MMLV reverse transcriptase coupled with thermostable DNA polymerase and DNA/RNA helicase. *Enzyme Microb. Technol.* 2017;96:111-120. DOI 10.1016/j.enzmictec.2016.10.003.

Palikša S., Alzbutas G., Skirgaila R. Decreased K_m to dNTPs in an essential M-MuLV reverse transcriptase adoption requires to perform efficient cDNA synthesis in One-Step RT-PCR assay. *Protein Eng. Des. Sel.* 2018;31(3):79-89. DOI 10.1093/protein/gzy003.

Petyuk V.A., Zenkova M.A., Giege R., Vlassov V.V. Hybridization of antisense oligonucleotides with the 3′ part of $tRNA^{Phe}$. *FEBS Lett.* 1999;444(2-3):217-221. DOI 10.1016/s0014-5793(99)00063-0.

Schultz S.J., Champoux J.J. RNase H activity: structure, specificity, and function in reverse transcription. *Virus Res.* 2008;134(1-2):86-103. DOI 10.1016/j.virusres.2007.12.007.

Skasko M., Weiss K.K., Reynolds H.M., Jamburuthugoda V., Lee K., Kim B. Mechanistic differences in RNA-dependent DNA polymerization and fidelity between murine leukemia virus and HIV-1 reverse transcriptases. *J. Biol. Chem.* 2005;280(13):12190-12200. DOI 10.1074/jbc.M412859200.

Wulf M.G., Maguire S., Humbert P., Dai N., Bei Y., Nichols N.M., Corrêa I.R., Jr, Guan S. Non-templated addition and template switching by Moloney murine leukemia virus (MMLV)-based reverse transcriptases co-occur and compete with each other. *J. Biol. Chem.* 2019;294:18220-18231. DOI 10.1074/jbc.RA119.010676.

ORCID ID
I.A. Pyshnaya orcid.org/0000-0002-7559-2376

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 19-34-90132.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 01.09.2021. После доработки 07.10.2021. Принята к публикации 08.10.2021.