

УДК 57.088.2

ЭФФЕКТИВНОСТЬ РАЗЛИЧНЫХ ДНК-ПОЛИМЕРАЗ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ ДЛИННЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ С ГЕНОМНОЙ ДНК И КДНК КУЛЬТУРНОГО КАРТОФЕЛЯ

© 2023 г. А. Д. Антипов¹, Н. Е. Злобин¹, *

¹Всероссийский научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, 127550 Россия

*e-mail: stresslab@yandex.ru

Поступила в редакцию 17.02.2023 г.

После доработки 28.02.2023 г.

Принята к публикации 01.03.2023 г.

Амплификация длинных фрагментов со сложных матриц, таких как геномная ДНК эукариот, является сложной задачей для большинства ДНК-полимераз. В работе проведено сравнение эффективности 6 вариантов ДНК-полимераз для амплификации с геномной ДНК картофеля *Solanum tuberosum* полноразмерных последовательностей генов, кодирующих факторы инициации трансляции семейства eIF4E, а также для синтеза фрагментов генома вируса Y картофеля с кДНК растений картофеля, зараженных этим вирусом. Было установлено, что эффективность амплификации различными ДНК-полимеразами в целом падала с увеличением длины ампликонов. Наибольшую эффективность синтеза длинных фрагментов продемонстрировали полимеразы LongAmp и Platinum SuperFi II, которые позволяли с высокой эффективностью синтезировать ПЦР-продукты длиной более 10 тысяч пар оснований, наименьшую — полимеразы Encyclo. Ни одна из ДНК-полимераз не обеспечила эффективную амплификацию всех исследованных фрагментов ДНК. В то же время, любой из исследованных фрагментов ДНК мог быть амплифицирован с помощью не менее чем одного варианта ДНК-полимеразы. Таким образом, выбор ДНК-полимеразы имел ключевое значение для эффективности синтеза определенного ПЦР-продукта.

Ключевые слова: полимеразная цепная реакция, ПЦР длинных фрагментов, ДНК-полимераза

DOI: 10.31857/S0555109923040025, **EDN:** QYRYJY

Полимеразная цепная реакция является одним из базовых методов, без которого практически невозможно представить работу современной молекулярно-биологической лаборатории. Отличительной особенностью этого метода является его универсальность, то есть способность эффективно синтезировать разнообразные нуклеотидные последовательности с образцов ДНК, выделенных из различных организмов. Однако все еще существуют некоторые приложения ПЦР, для которых этот метод демонстрирует сниженную эффективность, одним из которых является амплификация длинных последовательностей ДНК [1]. К длинным обычно относят ампликоны более 4–5 т.п.о. Амплификация подобных последовательностей не входит в число наиболее рутинных применений ПЦР, однако может требоваться для решения различных научных задач, связанных с молекулярным клонированием или генетическим анализом. Так, методы высокопроизводительного секвенирования позволяют осуществлять параллельное таргетное секвенирование большого количества ампликонов, позволяя характеризовать выбранный

участок генома в большом числе биологических образцов, что является относительно простой и дешевой альтернативой полногеномному секвенированию [2–6]. Секвенирование длинных ампликонов позволяет анализировать полные последовательности эукариотических генов или даже целых генетических кластеров [7–11], а также полных геномов вирусов [12–15].

Для эффективной амплификации длинных фрагментов предложены различные подходы, вплоть до весьма экзотических, например основанные на дизайне праймеров со специальными довесками, обеспечивающими внутримолекулярную гибридизацию ампликонов [16, 17], а также использовании дополнительных ферментов [18]. Широко применимым способом повышения эффективности синтеза длинных фрагментов в ПЦР является использование специальных ДНК-полимераз [8, 15, 19, 20]. Хотя амплификация длинных фрагментов и считается трудной задачей для большинства ДНК-полимераз, в настоящий момент имеется множество вариантов этих фермен-

тов, которые предлагаются производителями как специально предназначенные или, по крайней мере, подходящие для синтеза длинных ампликонов. Однако, как справедливо замечено в работе [8], объем информации об исследовании пригодности того или иного варианта полимеразы для амплификации длинных последовательностей в научной литературе обычно невелик. При этом, такие данные в целом можно считать более объективными, чем информация, предоставляемая производителями ДНК-полимераз.

Многие сельскохозяйственные растения имеют сложные полиплоидные геномы большого размера. Геномная ДНК, выделенная из растений с помощью стандартных методов, часто содержит большое количество различных примесей, отрицательно влияющих на эффективность ПЦР [21].

Цель работы — сравнение эффективности 6 вариантов ДНК-полимераз для амплификации длинных последовательностей с геномной ДНК картофеля *Solanum tuberosum* — растения, для которого характерно высокое содержание фенолов, ингибирующих ПЦР [22–24]. Кроме того, было осуществлено сравнение эффективности этих ДНК-полимераз для амплификации последовательности вируса Y картофеля (PVY) с кДНК, синтезированной с общей РНК зараженных PVY растений этой культуры.

МЕТОДИКА

Выделение нуклеиновых кислот. Выделение ДНК из растительного материала листовых тканей картофеля проводили модифицированным методом ЦТАБ [25]. Выделение общей РНК вируса из растительного материала листовых тканей картофеля, зараженного PVY, проводили реагентом ExtractRNA (“Евроген”, Россия) в соответствии с протоколом производителя. Контроль качества геномной ДНК и общей РНК осуществляли с помощью электрофореза в агарозном геле.

Получение кДНК вируса Y картофеля. Проверка зараженности PVY растений картофеля сорта Вектор осуществлялась с помощью набора реагентов PV-001 для дифференциальной диагностики и выявления РНК вирусов картофеля методом ОТ-ПЦР-РВ (“Синтол”, Россия). Из растений картофеля *S. tuberosum* сорта Вектор, зараженных PVY, была выделена общая РНК с использованием реагента ExtractRNA (“Евроген”, Россия). Получение кДНК вируса Y картофеля осуществлялось с использованием ProtoScript® II First Strand cDNA Synthesis Kit (“NEB”, США) в соответствии с протоколом производителя.

Подбор праймеров. Подбор праймеров для амплификации полноразмерных последовательностей генов факторов инициации трансляции eIF4E1, eIF4E2, eIF(iso)4E, nCBP осуществлялся к высококонсервативным участкам в 5'-некодирующих

областях этих генов (Fw-праймер) и 3'-некодирующих областях этих генов (Rv-праймер). Высококонсервативные участки были идентифицированы путем анализа имеющихся сборок геномов культурного картофеля *S. tuberosum* сортов MSH14-112 (GenBank: CP046696.1), P8 (GenBank: CP046682.1) и Solyntus (GenBank: CP055236.1), и дикого картофеля *Solanum pinnatisectum* (сорт CGN17745 (GenBank: CP047566.1). Подбор праймеров для амплификации полноразмерного PVY, а также его фрагментов осуществлялся к участкам PVY, консервативным по своей нуклеотидной последовательности в изолятах этого вируса, имеющих различное географическое происхождение (номера в GenBank: OUNKS, AB711155.1; T13, AB714135.1; v942490, EF016294.1; JYW-186, KF770835.1; GZ, MN381731.1; SL50V, MW595187.1). Последовательности праймеров приведены в табл. 1.

Полимеразная цепная реакция. Состав реакционной смеси соответствовал рекомендациям производителей ДНК-полимераз. Для расчета оптимальной температуры отжига праймеров использовались приложения “Tm calculator” фирм NEB (<https://tmcatalog.neb.com/#!/main>) и ThermoFisher Scientific (<https://www.thermofisher.com/de/de/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html>). Для полимеразы Encyclo (“Евроген”, Россия) расчет температуры отжига праймеров производился с помощью рекомендованной производителем формулы. ПЦР проводились в амплификаторе “MiniAmp™ Plus Thermal Cycler” (“ThermoFisher Scientific”, США). Условия амплификации приведены в табл. 2. В качестве матрицы использовали пулированную смесь геномной ДНК, выделенную из 10 растений картофеля сорта Жуковский ранний, разведенную в 10 раз ТЕ-буфером. Анализ продуктов амплификации производился методом электрофореза 2 мкл (для генов eIF4E) или 4 мкл, для фрагментов PVY) ПЦР-смеси в 1.2%-ном агарозном геле с использованием маркера 1 kb DNA Ladder (“Евроген”, Россия) в качестве стандарта. Все ПЦР были осуществлены и продукты амплификации проанализированы не менее, чем в трехкратной повторности.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Амплификация полноразмерных последовательностей генов факторов инициации трансляции eIF4E картофеля. Культурный картофель *S. tuberosum* содержит 4 гена, кодирующие факторы инициации трансляции eIF4E — базовый eIF4E1, наиболее гомологичный ему eIF4E2, характерный для различных представителей семейства *Solanaceae* [26], изоформу eIF4E — eIF(iso)4E, а также так называемый новый кэп-связывающий белок nCBP

Таблица 1. Последовательности праймеров, использовавшихся для амплификации

Праймер	Последовательность 5'–3'
Факторы инициации трансляции	
eIF4E1 Fw	tctcatctctcatctgtcctag
eIF4E1 Rv	cacgagttactcaaacagaagc
eIF4E2 Fw	ccataaccaacccacaaatttc
eIF4E2 Rv	ctgtattgattgcatcctgttg
eIF(iso)4E Fw	gccactaacatcaatcaattgg
eIF(iso)4E Rv	gctaatacgtacaatttcagtattgg
nCBP Fw	ccgattcggtttagaagaagg
nCBP Rv	gccagtactggggataatcc
Фрагменты генома вируса	
PVY F1	aattaaacaactcaataacataaga
PVY R1	gccaggtccaagcttt
PVY F2	gccaaagcttggaacctg
PVY R2	gcttcattgttctgccatca
PVY F3	tgatggcagaacaatgaag
PVY R3	gtctcctgattgaagtttacag

[27]. Последовательности генов, кодирующих все 4 варианта факторов инициации трансляции eIF4E картофеля, были идентифицированы в трех отсекуированных к настоящему моменту геномах культурного картофеля *S. tuberosum* и в дикорастущем виде *S. pinnatisectum*. К этим генам были подобраны праймеры (табл. 1), отжигающиеся на высококонсервативных участках в 5'-некодирующей области генов перед старт-кодоном и в 3'-некодирующей области генов после стоп-кодона. Амплификация последовательностей генов факторов инициации трансляции eIF4E картофеля осуществлялась с помощью 6 вариантов ДНК-полимераз – Q5, Phusion, LongAmp (“NEB”, США), Platinum SuperFi II, Phusion (“ThermoFisher Scientific”, США), Encyclo (“Евроген”, Россия). Все эти ДНК-полимеразы позиционируются производителями как пригодные для синтеза длинных ампликонов со сложных матриц, к которым относится геномная ДНК. Для каждого из четырех генов факторов инициации трансляции картофеля по крайней мере с некоторыми из вариантов полимераз удалось получить ПЦР-продукты (рис. 1), по своей длине приблизительно соответствующие предполагаемой длине этих генов. Исключение составлял ген eIF4E1, длина ПЦР-продукта для которого была существенно выше (7000 п.о.), чем предполагаемая из анализа данных сборок геномов (4000–5000 п.о.). Специфичность амплификации была подтверждена секвенированием по Сэнгеру 5'-концевых и 3'-концевых областей ПЦР-продуктов.

Наиболее эффективная амплификация различными вариантами полимераз наблюдалась в отношении генов eIF(iso)4E и nCBP. Эти гены эф-

фективно амплифицировались практически всеми исследованными ДНК-полимеразами, за исключением полимеразы Encyclo, продемонстрировавшей низкую эффективность амплификации в отношении гена eIF(iso)4E (рис. 1). Важно отметить, что в случае eIF(iso)4E различными вариантами полимераз амплифицировались два фрагмента несколько различающейся длины, при этом однако оба фрагмента представляли собой последовательности гена eIF(iso)4E, исходя из секвенирования их концевых участков (данные не приведены). Вероятно, два ПЦР-продукта различной длины обусловлены полиморфизмом гена eIF(iso)4E в сорте картофеля Жуковский ранний, предположительно содержанием в некодирующих областях этого гена протяженных делеций и/или вставок.

Ген eIF4E1 в картофеле сорта Жуковский ранний имел существенно большую длину, чем eIF(iso)4E и nCBP. Эффективная амплификация eIF4E1 наблюдалась с четырьмя вариантами ДНК-полимераз из шести – Q5, обоими вариантами полимеразы Phusion и с LongAmp, при этом последняя продемонстрировала наиболее высокую эффективность. В противоположность этому, амплификация с полимеразы Encyclo и Platinum SuperFi II не приводила к получению детектируемых количеств ПЦР-продукта eIF4E1.

Наименьшая эффективность амплификации наблюдалась в отношении наиболее длинного гена – eIF4E2, размер которого превышал 10000 п.о. Полимераза LongAmp амплифицировала этот ген с сопоставимой эффективностью по сравнению с остальными генами – eIF4E1, eIF(iso)4E и nCBP.

Таблица 2. Условия амплификации

фермент	Состав реакционной смеси	Условия ПЦР генов eIF4E	Условия ПЦР фрагментов 2, 3, 4 PVY	Условия ПЦР фрагмента 1 PVY
Q5	Буфер (5X) – 5 мкл, dNTP (10 mM) – 0.5 мкл, праймер Fw – 1.25 мкл, праймер Rv – 1.25 мкл, полимераза – 0.25 мкл, ДНК-матрица – 0.5 мкл, вода – 16.25 мкл	98°C 40 с 30 циклов 98°C 15 с 64°C 20 с 72°C 7 мин 72°C 10 мин	98°C 40 с 30 циклов 98°C 15 с 60°C 20 с 72°C 7 мин 72°C 10 мин	98°C 40 с 30 циклов 98°C 15 с 59°C 20 с 72°C 7 мин 72°C 10 мин
Platinum SuperFi II	Буфер (5X) – 4 мкл, dNTP (10 mM) – 0.4 мкл, праймер Fw – 1 мкл, праймер Rv – 1 мкл, полимераза – 0.4 мкл, ДНК-матрица – 0.5 мкл, вода – 12.7 мкл	98°C 40 с 30 циклов 98°C 15 с 60°C 20 с 72°C 7 мин 72°C 10 мин	98°C 40 с 30 циклов 98°C 15 с 60°C 20 с 72°C 7 мин 72°C 10 мин	98°C 40 с 30 циклов 98°C 15 с 60°C 20 с 72°C 7 мин 72°C 10 мин
Phusion (Thermo Fisher Scientific)	Буфер (5X) – 4 мкл, dNTP (10 mM) – 0.4 мкл, праймер Fw – 1 мкл, праймер Rv – 1 мкл, полимераза – 0.2 мкл, ДНК-матрица – 0.5 мкл, вода – 12.9 мкл	98°C 40 с 30 циклов 98°C 15 с 62°C 20 с 72°C 7 мин 72°C 10 мин	98°C 40 с 30 циклов 98°C 15 с 60°C 20 с 72°C 7 мин 72°C 10 мин	98°C 40 с 30 циклов 98°C 15 с 60°C 20 с 72°C 7 мин 72°C 10 мин
Phusion (NEB)	Буфер (5X) – 4 мкл, dNTP (10 mM) – 0.4 мкл, праймер Fw – 1 мкл, праймер Rv – 1 мкл, полимераза – 0.2 мкл, ДНК-матрица – 0.5 мкл, вода – 12.9 мкл	98°C 40 с 30 циклов 98°C 15 с 62°C 20 с 72°C 7 мин 72°C 10 мин	98°C 40 с 30 циклов 98°C 15 с 60°C 20 с 72°C 7 мин 72°C 10 мин	98°C 40 с 30 циклов 98°C 15 с 60°C 20 с 72°C 7 мин 72°C 10 мин
LongAmp	Буфер (5X) – 5 мкл, dNTP (10 mM) – 0.75 мкл, праймер Fw – 1 мкл, праймер Rv – 1 мкл, полимераза – 1 мкл, ДНК-матрица – 0.5 мкл, вода – 15.75 мкл	95°C 30 с 30 циклов 95°C 15 с 55°C 20 с 65°C 14 мин 65°C 10 мин	95°C 30 с 30 циклов 95°C 15 с 51°C 20 с 65°C 14 мин 65°C 10 мин	95°C 30 с 30 циклов 95°C 15 с 50°C 20 с 65°C 14 мин 65°C 10 мин
Encyclo	Буфер (10X) – 2.5 мкл, dNTP (10 mM) – 0.5 мкл, праймер Fw – 1 мкл, праймер Rv – 1 мкл, полимераза – 0.5 мкл, ДНК-матрица – 0.5 мкл, вода – 19 мкл	95°C 30 с 30 циклов 95°C 15 с 66°C* 20 с 65°C 14 мин 65°C 10 мин	95°C 30 с 30 циклов 95°C 15 с 58°C 20 с 65°C 14 мин 65°C 10 мин	95°C 30 с 30 циклов 95°C 15 с 55°C 20 с 65°C 14 мин 65°C 10 мин

* 63°C при амплификации последовательности гена пСВР.

Полимеразы Platinum SuperFi II, Phusion (“NEB”) и Phusion (“ThermoFisher Scientific”) также позволяли осуществить амплификацию eIF4E2, хотя эффективность ПЦР была очевидно ниже по

сравнению с амплификацией этими полимеразой других трех генов факторов инициации трансляции картофеля. Амплификация eIF4E2 с помощью полимеразы Q5 позволила получить лишь

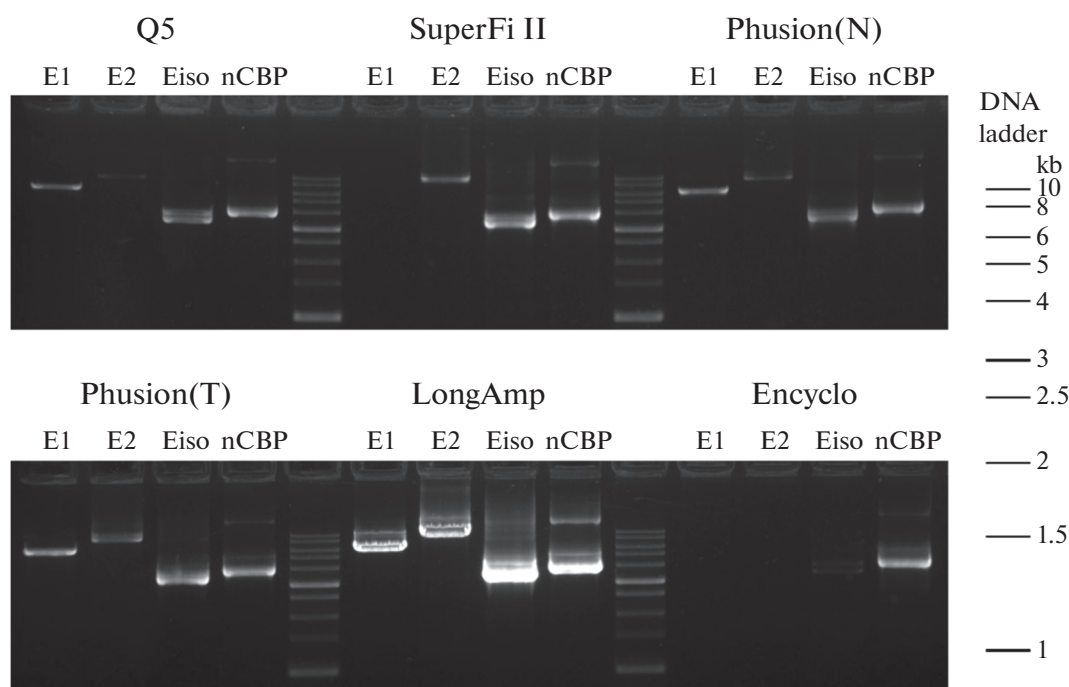


Рис. 1. Амплификация факторов трансляции картофеля eIF4E1 (E1), eIF4E2 (E2), eIF(iso)4E (Eiso) и nCBP 6 вариантами ДНК-полимераз. Phusion(N) — полимеразы Phusion фирмы-производителя “NEB”, Phusion(T) — полимеразы Phusion фирмы-производителя “ThermoFisher Scientific”.

незначительное количество ПЦР-продукта, в то время как использование полимеразы Encyclo не позволило амплифицировать eIF4E2.

Амплификация полноразмерной последовательности вируса Y картофеля PVY с кДНК зараженных растений картофеля. Вирус Y картофеля PVY является наиболее значимым вирусным патогеном этой культуры, геном которого представлен одноцепочечной положительной РНК [28]. Из зараженных PVY растений картофеля сорта Вектор была выделена общая РНК и получена кДНК. С праймеров, отжигающихся на консервативных участках на 5'- и 3'-конце генома PVY, была осуществлена амплификация полноразмерного генома этого вируса с использованием тех же 6 вариантов ДНК-полимераз, которые использовались для амплификации генов факторов инициации трансляции картофеля. Использование полимераз Q5, Phusion (“NEB”), Phusion (“ThermoFisher Scientific”) и Encyclo не привело к накоплению ампликона полноразмерного генома PVY в визуальном детектируемых количествах (рис. 2а). Амплификации удалось добиться с помощью полимераз LongAmp и Platinum SuperFi II, однако накопление ПЦР-продукта в обоих случаях было низким. Кроме того, при амплификации полноразмерного PVY полимеразой LongAmp наблюдалось также образование более короткого ПЦР-продукта длиной около 7000 п.о.

Поскольку эффективной амплификации полного генома PVY не удалось добиться ни с одним из шести исследованных вариантов ДНК-полимераз, к последовательности генома PVY были подобраны внутренние праймеры на высококонсервативные участки, которые позволяли амплифицировать геном PVY в виде перекрывающихся фрагментов (рис. 2б). Фрагмент 1, включавший практически половину генома PVY с 5'-конца и имевший длину около 4800 п.о., в отличие от полного генома PVY амплифицировался большинством вариантов ДНК-полимераз, за исключением Phusion (“ThermoFisher Scientific”). Однако количество синтезированного ПЦР-продукта во всех случаях было низким. Фрагмент 2, включавший в себя 3'-часть генома PVY длиной около 5200 п.о., амплифицировался всеми исследованными вариантами ДНК-полимераз. При этом, выход ПЦР-продукта был высоким для всех вариантов полимераз, кроме Phusion (“ThermoFisher Scientific”).

Фрагмент 3 генома PVY, включавший в себя весь фрагмент 2 и около половины фрагмента 1, имел длину приблизительно 7500 п.о. Увеличение длины амплифицируемой 3'-части генома PVY несколько снизило эффективность амплификации для полимераз Q5 и LongAmp, но не для полимеразы Platinum SuperFi II. Полимеразы Encyclo, Phusion (“NEB”) и Phusion (“ThermoFisher Scientific”) оказались неспособны амплифицировать фрагмент 3, при том что две из них — Encyclo

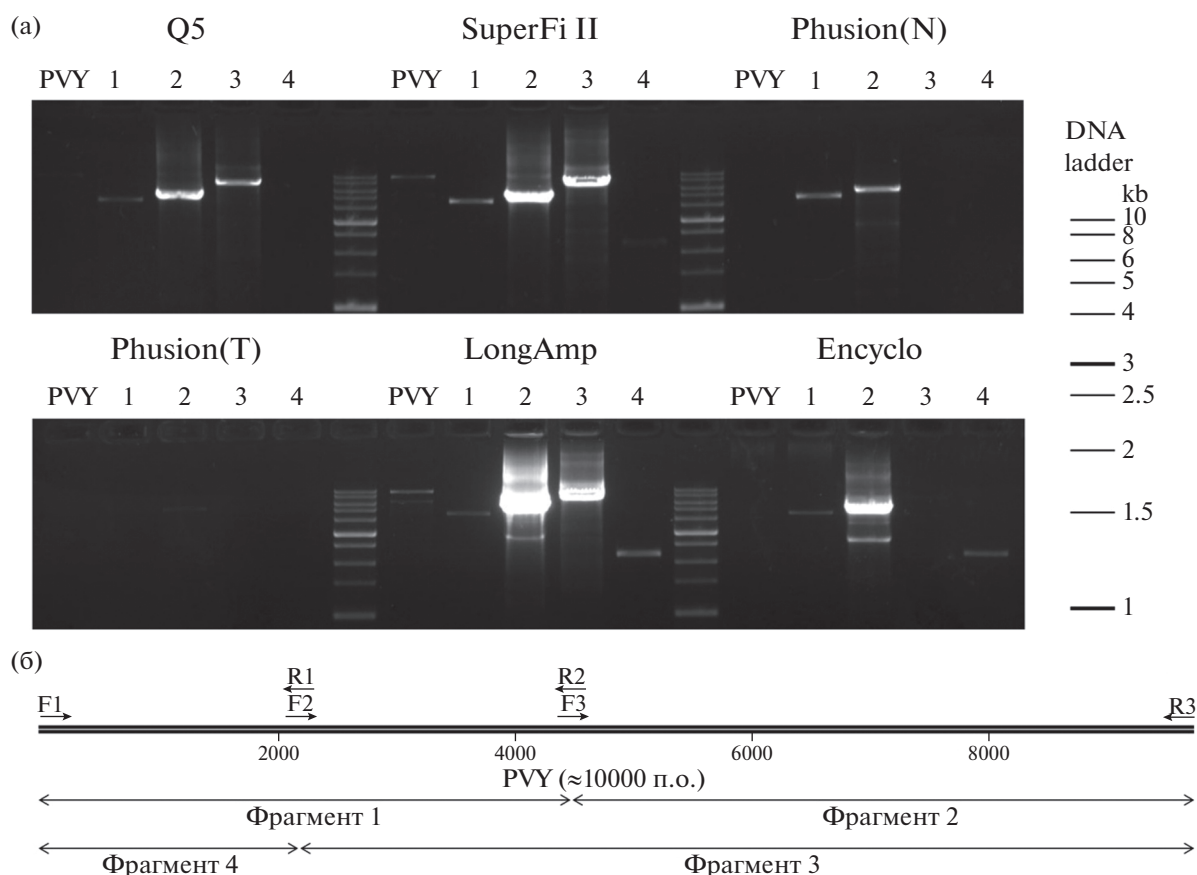


Рис. 2. Амплификация полноразмерного генома вируса Y картофеля (PVY) и 4 фрагментов генома вируса (фрагменты 1, 2, 3, 4) с использованием 6 вариантов ДНК-полимераз (а) и схематическое изображение генома PVY, 4 фрагментов генома и расположения праймеров, использовавшихся для амплификации (б). Названия праймеров для амплификации фрагментов генома PVY соответствуют приведенным в табл. 1.

и Phusion (“NEB”) — эффективно амплифицировали более короткий фрагмент 2. Фрагмент 4, включавший 5'-часть генома PVY, амплифицировался в детектируемых количествах только 3 вариантами ДНК-полимераз из 6 — Platinum SuperFi II, Longamp и Encyclo, несмотря на свой небольшой размер (приблизительно 2200 п.о.).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В этой работе была исследована эффективность 6 вариантов ДНК-полимераз для амплификации длинных нуклеотидных последовательностей с матрицы геномной ДНК и кДНК растений картофеля. В целом, эффективность амплификации при увеличении длины ПЦР-продукта ожидаемо снижалась. Среди факторов инициации трансляции семейства eIF4E, наибольшая эффективность амплификации для всех вариантов ДНК-полимераз наблюдалась в отношении генов eIF(iso)4E и nCBP, длина ампликона для которых была менее 4 т.п.о., т.е. они не относились к условной категории “длинных ампликонов”. Из всех вариантов поли-

мераз, только Encyclo показала неудовлетворительную эффективность в отношении одного из этих относительно коротких ампликонов — eIF(iso)4E. В противоположность этому, добиться высокоэффективной амплификации наиболее длинного гена eIF4E2 удалось с использованием единственного варианта ДНК-полимеразы — LongAmp. Полимераза Platinum SuperFi II также позволяла достаточно эффективно амплифицировать eIF4E2, однако выход ПЦР-продукта был существенно ниже, чем при использовании LongAmp.

При проведении ПЦР с использованием кДНК в качестве матрицы добиться высокоэффективной амплификации полного генома PVY длиной около 10000 п.о. не удалось ни с одним вариантом полимеразы, хотя с помощью Platinum SuperFi II и LongAmp удалось синтезировать визуально детектируемые количества ампликона полноразмерного PVY. Низкий выход ПЦР может быть связан не только с большим размером ампликона, но и с низкой эффективностью амплификации 5'-части генома PVY, наблюдавшейся для всех вариантов ДНК-полимераз. Это по всей видимости опреде-

ляется худшим качеством синтеза кДНК с 5'-частей длинных молекул мРНК, поскольку синтез кДНК происходит в направлении 5'–3' [29]. Действительно, эффективность амплификации фрагментов 2 и 3, расположенных в 3'-части генома PVY, была намного выше, чем фрагментов 1 и 4, расположенных в 5'-части генома вируса, при большей длине ампликонов (рис. 2).

Все исследованные варианты ДНК-полимераз позиционируются производителями как пригодные для амплификации длинных фрагментов. Указанные производителями максимальные длины ПЦР-продукта, допускающие эффективную амплификацию, составляют 20 т.п.о. для Encyclo, Platinum SuperFi II и Phusion ("ThermoFisher Scientific"), и 30 т.п.о. для LongAmp; для Q5 и Phusion ("NEB") численные данные не приведены. Поскольку протяженность даже наиболее длинных из ампликонов, исследованных в настоящей работе, существенно меньше этих значений, сниженная эффективность их амплификации вероятно связана не только с размерами этих ампликонов, но и с использованием сложных матриц при проведении ПЦР. Загрязнение геномной ДНК картофеля веществами-ингибиторами ПЦР, а также сниженное качество синтеза длинных молекул кДНК, снижает общую эффективность амплификации, что в сочетании с повышенной сложностью синтеза длинных ампликонов вероятно и привело к наблюдаемой в целом невысокой эффективности амплификации наиболее длинных фрагментов как с геномной ДНК, так и с кДНК.

Наибольшую эффективность в амплификации различных длинных последовательностей — как генов eIF4E, так и фрагментов PVY, — продемонстрировала полимераз LongAmp. Использование этой полимеразы позволяло осуществить синтез всех генов eIF4E и всех фрагментов PVY. Однако, если при амплификации генов eIF4E полимераз LongAmp показала эффективность значительно большую, чем остальные варианты ДНК-полимераз, то при амплификации фрагментов PVY для 3 из 5 вариантов фрагментов выход ПЦР-продуктов был низким. Полимераза Platinum SuperFi II, которая в этой работе также продемонстрировала в целом высокую эффективность амплификации различных последовательностей, оказалась неспособной амплифицировать ген eIF4E1, с амплификацией которого справились все остальные варианты полимераз, кроме Encyclo. Оба варианта Phusion продемонстрировали достаточно высокую эффективность при амплификации генов eIF4E; в то же время, полимераз Phusion ("NEB") эффективно амплифицировала только некоторые фрагменты генома PVY, в то время как полимераз Phusion ("ThermoFisher Scientific") — ни один из фрагментов PVY. Приведенные выше результаты свидетельствуют о наличии у ДНК-полимераз специфических сложностей с синтезом определенных

ампликонов, разных для различных полимераз. Из этого следует, что для достижения эффективной амплификации конкретной последовательности выбор ДНК-полимеразы имеет ключевое значение. Например, полимераз Encyclo, которая в настоящей работе в целом продемонстрировала наименьшую эффективность, амплифицировала фрагмент 4 PVY более эффективно, чем полимеразы Q5, Platinum SuperFi II и оба варианта полимеразы Phusion.

По литературным данным, синтез коротких нецелевых последовательностей может быть одним из существенных затруднений при проведении ПЦР длинных фрагментов, что определяется в целом более высокой эффективностью синтеза коротких фрагментов по сравнению с длинными [17]. Однако в настоящей работе появление более коротких нецелевых ПЦР-продуктов наряду с длинным целевым практически не наблюдалось, за исключением синтеза небольшого количества коротких нецелевых продуктов при амплификации полноразмерного PVY полимеразой LongAmp, а также фрагмента 2 PVY — некоторыми вариантами полимераз, что указывает на высокую специфичность амплификации.

Полимераза LongAmp, которая в настоящей работе продемонстрировала высокую эффективность, характеризуется относительно невысокой точностью амплификации, по заявлениям производителя ("NEB") превышающей точность Taq-полимеразы в 2 раза. Низкая точность накладывает ограничения на применимость этой полимеразы для таких приложений, как например клонирование длинных последовательностей при создании генетических конструкций. Полимераза Platinum SuperFi II, которая характеризуется намного более высокой точностью синтеза, в данной работе проявила способность эффективно синтезировать различные длинные ампликоны. Эта полимераз успешно применялась для амплификации длинных последовательностей различного происхождения [30–36]. Недостатком полимеразы Platinum SuperFi II является ее высокая стоимость, которая значительно превышает стоимость большинства коммерчески доступных ДНК-полимераз, в том числе всех ферментов, исследованных в этой работе.

Ни одна из исследованных в этой работе ДНК-полимераз не обеспечивала эффективную амплификацию всех целевых фрагментов ДНК. В то же время, практически любой из представленных в данном исследовании фрагментов ДНК или кДНК, в том числе длинных (~5000 п.о. и более), мог быть эффективно амплифицирован с использованием по крайней мере одного варианта ДНК-полимеразы. Исходя из этого, при воз-

никновении перед исследователем необходимости в амплификации длинных фрагментов ДНК, в особенности со сложных матриц, к которым относится геномная ДНК многих растений, можно рекомендовать экспериментальную валидацию нескольких вариантов ДНК-полимераз как эффективный способ добиться удовлетворительной амплификации целевого участка генома.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского Научного Фонда № 21-76-10050 с использованием оборудования Центра коллективного пользования “Биотехнология” Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной биотехнологии (соглашение RFMEFI62114×0003).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Karunanathie H., Kee P.S., Ng S.F., Kennedy M.A., Chua E.W. // *Biochimie*. 2022. V. 197. P. 130–143. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2022.02.009>
2. Knierim E., Lucke B., Schwarz J.M., Schuelke M., See-
low D. // *PloS One*. 2011. V. 6. № 11. P. e28240. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028240>
3. Qiao W., Yang Y., Sebra R., Mendiratta G., Gaedigk A., Desnick R.J., Scott S.A. // *Hum. Mutat.* 2016. V. 37. № 3. P. 315–323. <https://doi.org/10.1002/humu.22936>
4. Martijn J., Lind A.E., Schön M.E., Spiertz I., Juzokaite L., Bunikis I. et al. // *Environ. Microbiol.* 2019. V. 21. № 7. P. 2485–2498. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14636>
5. Karst S.M., Ziels R.M., Kirkegaard R.H., Sørensen E.A., McDonald D., Zhu Q., Knight R., Albertsen, M. // *Nat. Methods*. 2021. V. 18. № 2. P. 165–169. <https://doi.org/10.1038/s41592-020-01041-y>
6. Brait N., Külleçi B., Goerzer I. // *BMC Genomics*. 2022. V. 23. № 1. P. 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-08272-z>
7. Briscoe A.G., Goodacre S., Masta S.E., Taylor M.I., Arnedo M.A., Penney D., Kenny J., Creer S. // *PLoS One*. 2013. V. 8. № 5. P. e62404. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062404>
8. Jia H., Guo Y., Zhao W., Wang K. // *Sci. Rep.* 2014. V. 4. № 1. P. 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep05737>
9. Ozaki Y., Suzuki S., Shigenari A., Okudaira Y., Kikkawa E., Oka A. et al. // *Tissue Antigens*. 2014. V. 83. № 1. P. 10–16. <https://doi.org/10.1111/tan.12258>
10. Deiner K., Renshaw M.A., Li Y., Olds B.P., Lodge D.M., Pfrender M.E. // *Methods Ecol. Evol.* 2017. V. 8. № 12. P. 1888–1898. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12836>
11. Togi S., Ura H., Niida Y. Optimization and Validation of Multimodular // *J. Mol. Diagn.* 2021. V. 23. № 4. P. 424–446. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2020.12.009>
12. Günther S., Sommer G., Von Breunig F., Iwanska A., Kalinina T., Sterneck M., Will H. // *J. Clin. Microbiol.* 1998. V. 36. № 2. P. 531–538. <https://doi.org/10.1128/JCM.36.2.531-538.1998>
13. Trémeaux P., Caporossi A., Ramière C., Santoni E., Tarrbouriech N., Thélu M.A. et al. // *Clin. Microbiol. Infect.* 2016. V. 22. № 5. P. 460–e1. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.01.015>
14. Joffret M.L., Polston P.M., Razafindratsimandresy R., Bessaud M., Heraud J.M., Delpeyroux F. // *Front. Microbiol.* 2018. V. 9. P. 2339. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02339>
15. Isaacs S.R., Kim K.W., Cheng J.X., Bull R.A., Stelzer-Braid S., Luciani F. et al. // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. № 1. P. 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30322-y>
16. Shagin D.A., Lukyanov K.A., Vagner L.L., Matz M.V. // *Nucleic Acids Res.* 1999. V. 27. № 18. P. e23–i. <https://doi.org/10.1093/nar/27.18.e23-i>
17. Zhao Z., Xie X., Liu W., Huang J., Tan J., Yu H., Zong W. et al. // *Mol. Plant.* 2022. V. 15. № 4. P. 620–629. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2021.12.018>
18. Ignatov K.B., Kramarov V.M. // *Biochemistry (Moscow)*. 2009. V. 74. № 5. P. 557–561. <https://doi.org/10.1134/S0006297909050113>
19. Cheng S., Fockler C., Barnes W.M., Higuchi R. // *PNAS*. 1994. V. 91. № 12. P. 5695–5699. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.12.5695>
20. Waggott W. // *Humana Press*. 1998. V. 16. P. 81–91. <https://doi.org/10.1385/0-89603-499-2:81>
21. Kasajima I. // *Trends Res.* 2018. V. 1. P. 1–2. <https://doi.org/10.15761/TR.1000115>
22. Singh R.P., Singh M., King R.R. // *J. Virol. Methods*. 1998. V. 74. № 2. P. 231–235. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(98\)00092-5](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(98)00092-5)
23. Singh R.P., Nie X., Singh M., Coffin R., Duplessis P. // *J. Virol. Methods*. 2002. V. 99. № 1–2. P. 123–131. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(01\)00391-3](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(01)00391-3)
24. Valcarcel J., Reilly K., Gaffney M., O'Brien N.M. // *Potato Res.* 2015. V. 58. № 3. P. 221–244. <https://doi.org/10.1007/s11540-015-9299-z>
25. Анисимова И.Н., Алматыева Н.В., Абдуллаев Р.А., Карабицина Ю.И., Кузнецова Е.Б. Скрининг генетических ресурсов растений с использованием ДНК-маркеров: основные принципы, выделение ДНК, постановка ПЦР, электрофорез в агарозном геле. / Ред. Радченко Е.Е.: Методические указания ВИР. СПб: ВИР, 2018. 47 с. <https://doi.org/10.30901/978-5-905954-81-8>
26. Moury B., Charron C., Janzac B., Simon V., Gallois J.L., Palloix A., Caranta C. // *Infect. Genet. Evol.* 2014. V. 27. P. 472–480. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.11.024>
27. Luciola A., Tavazza R., Baima S., Fatyol K., Burgyan J., Tavazza M. // *Front. Microbiol.* 2022. V. 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.873930>
28. Quenouille J., Vassilakos N., Moury B. // *Plant Pathol.* 2013. V. 14. № 5. P. 439–452. <https://doi.org/10.1111/mpp.12024>

29. Suzuki Y., Sugano S. // *Genomics Protocols*. 2001. V. 175. P. 143–153.
<https://doi.org/10.1385/1-59259-235-X:143>
30. Ling A.K., Munro M., Chaudhary N., Li C., Berru M., Wu B., Durocher D., Martin A. // *EMBO Rep*. 2020. V. 21. № 8. P. e49823.
<https://doi.org/10.15252/embr.201949823>
31. Xie X., Muruato A., Lokugamage K.G., Narayanan K., Zhang X., Zou J., Liu J. et al. // *Cell Host Microbe*. 2020. V. 27. № 5. P. 841–848.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.04.004>
32. Sannier G., Dube M., Dufour C., Richard C., Brassard N., Delgado G.G., Pagliuzza A., Baxter A.E., Niessl J., Brunet-Ratnasingham E., Charlebois R., Routy B., Routy J.P., Fromentin R., Chomont N., Kaufmann D.E. // *Cell Rep*. 2021. V. 36. № 9.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109643>
33. Keraite I., Becker P., Canevazzi D., Frias-López C., Dabad M., Tonda-Hernandez R., Paramonov I., Ing-ham M.J., Brun-Heath I., Leno J., Abulí A., Garcia-Ar-umí E., Heath S.C., Gut M., Gut I.G. // *Nat. Commun*. 2022. V. 13. № 1. P. 1–12.
<https://doi.org/10.1038/s41467-022-33530-3>
34. Maniego J., Pesko B., Habershon-Butcher J., Hincks P., Taylor P., Tozaki T., Ohnuma A., Stewart G., Proudman C., Ryder E. // *Drug Testing and Analysis*. 2022. V. 14. № 8. P. 1429–1437.
<https://doi.org/10.1002/dta.3267>
35. Tasca F., Brescia M., Wang Q., Liu J., Janssen J.M., Szuhai K., Gonçalves M.A. // *Nucleic Acids Res*. 2022. V. 50. № 13. P. 7761–7782.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkac567>
36. Vincendeau E., Wei W., Zhang X., Planchais C., Yu W., Lenden-Hasse H., Cokelaer T., da Fonseca J.P., Mouquet H., Adams D.J., Alt F.W., Jackson S.P., Balmus G., Lescale C., Deriano L. // *Nat. Commun*. 2022. V. 13. № 1. P. 1–16.
<https://doi.org/10.1038/s41467-022-31287-3>

The Efficiency of Various DNA Polymerases for Amplification of Long Sequences from Genomic DNA and cDNA of Cultivated Potato

A. D. Antipov^a and N. E. Zlobin^{a, *}

^aAll-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Timiryazevskaya, 42, Moscow, 127550 Russia

*e-mail: stresslab@yandex.ru

Amplification of long fragments from complex templates, such as eukaryotic genomic DNA, is considered a difficult task for most DNA polymerases. In this research, 6 variants of DNA polymerases were used to amplify full-length sequences from the genomic DNA of *Solanum tuberosum* genes encoding translation initiation factors of the eIF4E family, as well as for the synthesis of fragments of the potato Y virus genome from cDNA of potato plants infected by this virus. It was found that the efficiency of amplification by various DNA polymerases generally decreased with increasing length of the amplicons. LongAmp and Platinum SuperFi II polymerases demonstrated the highest efficiency in the synthesis of long fragments, which made it possible to synthesize PCR products with a length of more than 10,000 base pairs with high efficiency. The lowest efficiency was demonstrated by Encyclo polymerase. None of the DNA polymerases provided efficient amplification of all the studied DNA fragments. At the same time, any of the studied DNA fragments could be effectively amplified using at least one DNA polymerase variant. Thus, the choice of DNA polymerase was of key importance for the efficiency of the synthesis of a desired PCR product.

Keywords: polymerase chain reaction, long-range PCR, DNA polymerase