

**ХИМИЯ И ТЕХНОЛОГИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ
И БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ**
**CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF MEDICINAL COMPOUNDS
AND BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES**

ISSN 2410-6593 (Print), ISSN 2686-7575 (Online)

<https://doi.org/10.32362/2410-6593-2021-16-2-148-155>



УДК 577.113.4

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

Изучение множественного встраивания модифицированных нуклеотидов в растущую цепь ДНК

О.С. Волкова[®], А.В. Чудинов, С.А. Лапа

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

[®] Автор для переписки, e-mail: olechka.volckowa@yandex.ru

Аннотация

Цели. Целью данной работы является изучение субстратных свойств модифицированных производных трифосфатов дезоксинуклеозидов пуриновой и пиримидиновой природы (5-пропинил-2'-деоксиуридин-5'-трифосфат, 5-пропинил-2'-деоксицитидин-5'-трифосфат, 5-метил-2'-деоксицитидин-5'-трифосфат, N⁶-метил-2'-дезоксаденозин-5'-трифосфат) при их одновременном встраивании в процессе ферментативных реакций (полимеразной цепной реакции и реакции удлинения праймера).

Методы. В работе для изучения субстратной эффективности модифицированных трифосфатов дезоксинуклеозидов использовали методы полимеразной цепной реакции в режиме реального времени и реакции удлинения праймера. Использовали различные попарные сочетания модифицированных производных, в качестве матриц применяли специальным образом сконструированные синтетические фрагменты ДНК и библиотеки для SELEX. Реакции проводили с применением ДНК-полимераз: Taq, Vent (exo-), DeepVent (exo-) и KOD XL.

Результаты. В каждом случае из исследуемых соединений выбирали пару соединений (модифицированные dUTP + dCTP, dUTP + dATP, dCTP + dATP) для изучения одновременного встраивания в растущую цепь ДНК. Найдены наиболее эффективные сочетания нуклеотидов для одновременного встраивания, а именно: dU и dC, имеющие 5-пропинильный заместитель. Также найдена наиболее эффективная (из протестированных) ДНК-полимераза: Vent (exo-).

Выводы. Выбранные соединения можно использовать для ферментативного получения модифицированных ДНК, в частности аптамеров с расширенными физико-химическими свойствами.

Ключевые слова: модифицированные нуклеотиды, модифицированные аптамеры, полимеразная цепная реакция в режиме реального времени, реакция удлинения праймера

Для цитирования: Волкова О.С., Чудинов А.В., Лапа С.А. Изучение множественного встраивания модифицированных нуклеотидов в растущую цепь ДНК. *Тонкие химические технологии*. 2021;16(2):148–155. <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2021-16-2-148-155>

RESEARCH ARTICLE

Study of the multiple incorporation of modified nucleotides into the growing DNA strand

Olga S. Volkova[@], Alexander V. Chudinov, Sergey A. Lapa

Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

[@]Corresponding author, e-mail: olechka.volckowa@yandex.ru

Abstract

Objectives. This study investigated the substrate properties of the modified derivatives of triphosphates of purine and pyrimidine deoxynucleosides (5-propynyl-2'-deoxyuridine-5'-triphosphate, 5-propynyl-2'-deoxycytidine-5'-triphosphate, 5-methyl-2'-deoxycytidine-5'-triphosphate, and N⁶-methyl-2'-deoxyadenosine-5'-triphosphate) during their simultaneous incorporation in enzymatic reactions (polymerase chain and primer extension reactions).

Methods. The real-time polymerase chain and primer extension reactions were used to study the substrate efficiency of modified deoxynucleotide triphosphates. Various pairwise combinations of modified derivatives were used; specially designed synthetic DNA fragments and libraries for the Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment technology were used as templates. Reactions were conducted using DNA polymerases: Taq, Vent (exo-), DeepVent (exo-), and KOD XL.

Results. In each case, a pair of compounds (modified dUTP + dCTP, dUTP + dATP, and dCTP + dATP) was selected to study the simultaneous incorporation into the growing DNA strand. The most effective combinations of nucleotides for simultaneous insertion were dU and dC, having 5-propynyl substitution. The Vent (exo-) DNA polymerase was found as the most effective for the modified substrates.

Conclusions. The selected compounds can be used for the enzymatic preparation of modified DNA, including aptamers with extended physicochemical properties.

Keywords: modified aptamers, modified nucleotides, primer extension reaction, real-time polymerase chain reaction

For citation: Volkova O.S., Chudinov A.V., Lapa S.A. Study of the multiple incorporation of modified nucleotides into the growing DNA strand. *Tonk. Khim. Tekhnol. = Fine Chem. Technol.* 2021;16(2):148–155 (Russ., Eng.). <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2021-16-2-148-155>

ВВЕДЕНИЕ

Модифицированные нуклеиновые кислоты в настоящее время применяются во многих областях: молекулярной биологии [1], терапии [2], диагностике [3], аналитической химии [4]. Благодаря химическому разнообразию, модифицированные нуклеиновые кислоты возможно применять для введения в образцы флуоресцентных меток, селекции аптамеров [5, 6]. Одним из способов получения модифицированных нуклеиновых кислот является ферментативный синтез ДНК- или РНК-полимеразами с использованием модифицированных 2'-дезоксинуклеозидтрифосфатов (dNTP) в качестве субстратов [7, 8]. Использование модификаций с функциональными группами (например, аналогами боковых цепей аминокислот) позволяет увеличить сродство аптамеров к белковым мишеням [9].

Аптамеры – это короткие одноцепочечные молекулы ДНК или РНК, которые способны взаимодействовать с молекулами-мишенями. Получение аптамеров осуществляют с помощью технологии SELEX (от англ. «Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment» – систематическая эволюция лигандов при экспоненциальном обогащении). Модификация структуры аптамеров позволяет улучшить их физико-химические свойства и связывание с молекулами-мишенями [10]. Для введения модификаций наиболее часто используют ферментативный метод (в подавляющем большинстве случаев применяют реакцию удлинения праймера) с использованием модифицированных производных трифосфатов дезоксинуклеозидов. Получение аптамеров, содержащих различные функциональные группы, потенциально способно увеличить сродство к их мишеням за счет большего разнообразия типов взаимодействия аптамер-мишень.

Появляются первые сообщения о том, что одновременное встраивание нуклеотидов с разными модификациями позволяет улучшить свойства получаемых модифицированных аптамеров [11]. Главной задачей при использовании ферментативного метода является субстратная совместимость модифицированных производных с ДНК-полимеразами.

В настоящей работе мы провели оценку эффективности двух ферментативных методов: полимеразной цепной реакции (ПЦР) и реакции удлинения праймера (primer extension reaction – PEX), сравнили эффективность различных полимераз с отсутствующей 3'-5' корректирующей экзонуклеазной активностью для попарного одновременного встраивания модифицированных нуклеотидов в одну растущую цепь ДНК.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Модифицированные аналоги трифосфатов дезоксинуклеозидов: все соединения произведены фирмой *TriLink BioTechnologies, Inc.* (Сан-Диего, Калифорния, США): N-2016, N-2017, N-2025, N-2026.

ДНК-матрицы: для проведения PEX использовали синтетические ДНК-матрицы длиной 49 нт, последовательности которых приведены ниже:

M1U 5'-СТААААСТСТАААСТСТААСТСТАСТ-
GGCTACCAGTATGGAGCTGACAG-3'

M1A 5'-СТТТТТСТСТТТТТСТТТТСТТТСТТТСТ-
GGCTACCAGTATGGAGCTGACAG-3'

M2UA 5'-СТТАТАСТСТАТАСТСТТАСТСТАСТ-
GGCTACCAGTATGGAGCTGACAG-3'

M2AU 5'-СТАТАТСТСТТАТСТСТАТСТСТТСТ-
GGCTACCAGTATGGAGCTGACAG-3'

Синтетические матрицы, использованные для изучения встраивания модифицированных dC, были указаны ранее [12].

Полужирным шрифтом отмечены нуклеотиды, комплементарные исследуемым. Курсивом выделен праймерный участок. Последовательность используемого праймера:

5'-СТGTCAGCTCCATACTGGTAGCC-3'

Для проведения ПЦР использовали комбинаторную ДНК-библиотеку и соответствующие праймеры [13].

ДНК-полимеразы: в работе использованы следующие полимеразы: Taq (*Thermo Scientific*, Уолтем, Массачусетс, США), Vent (*exo-*), Deep Vent (*exo-*) (*New England Biolabs*, Ипсвич, Массачусетс, США), KOD XL (*NovaTaq™*, *Merck KGaA*, Дармштадт, Германия) в реакционных буферах и в концентрациях, рекомендованных производителями.

Твердофазный синтез матричных олигонуклеотидов

Твердофазный синтез матричных олигонуклеотидов осуществляли с помощью автоматического синтезатора ABI 394 DNA/RNA (*Applied Biosystems*, Фостер Сити, Калифорния, США), по стандартному регламенту с использованием коммерческих растворителей и реагентов.

Хроматографическая очистка матричных олигонуклеотидов

Для хроматографической очистки олигонуклеотидов использовали колонку BDS Hypersil C18 (*Thermo Scientific*) размером 250 × 4.6 мм, размер частиц 5 мкм, в системе элюентов: буфер А – 0.1 М ТЕАА, буфер Б – 50% ацетонитрила в буфере А. Оба буфера готовили с использованием milliQ и CH₃CN для высокоэффективной жидкостной хроматографии ChromAR® HPLC (MACRON), фильтровали через фильтр ZAPCAP-CR Nylon 0.22 мкм 47 мм (*Sigma-Aldrich*, Сент-Луис, Миссури, США). Разделение

проводили при температуре 25 °С. Скорость подачи элюента 1 мл/мин. Детекция проводилась на двух длинах волн: λ_1 270 нм и λ_2 295 нм. Шприцы BD 1 мл (*Becton Dickinson*, Франклин Лейкс, Нью-Джерси, США) (без иглы). Сменные фильтры для шприцов Acrodisc® LC 13 мм с 0.2 мкм PVDF мембраной, HPLC Certified (*PALL Corporation*, Нью-Йорк, США).

Реакция удлинения праймера

Реакционная смесь содержала природные dATP и dGTP (при изучении встраивания модифицированного дезоксиаденозина – природные dGTP и dCTP) в концентрации 0.2 мМ каждого, а также различные сочетания трифосфатов дезоксинуклеозидов, указанные на рис. 1; 1.5U Taq- либо 0.5U Vent (*exo*-) ДНК-полимеразы (реакционный буфер соответствовал примененной полимеразе); праймер для PEX; одну из синтетических матриц. Реакцию проводили на ДНК-амплификаторе MiniCycler (*MJ Research Inc.*, Геркулес, Калифорния, США) по следующей программе: 5 мин при 95 °С; далее 30 с при 65 °С и 40 мин при 78 °С.

ПЦР в режиме реального времени

Использовали смесь, аналогичную примененной для реакции удлинения праймера, а также два фланкирующих праймера вместо одного в случае PEX. Для визуализации процесса в реакционную смесь добавляли краситель EvaGreen (*Biotium*, Москва, Россия). Амплификацию проводили на приборе IQ5 (*Bio-Rad Laboratories, Inc.*, Геркулес, Калифорния, США) по следующей программе: предварительный нагрев при 95 °С в течение 3 мин, затем 40 циклов: 95 °С в течение 20 с, 66 °С в течение 30 с, 72 °С в течение 40 с. После этого 72 °С в течение 5 мин завершающая инкубация.

Определение выхода продуктов реакции

Полученные ПЦР-продукты разделяли в 4% агарозном геле. Окрашивание проводили бромидом этидия. Количество продукта оценивали по оптической плотности соответствующих полос в дорожках геля с использованием программы ImageJ (*National Institutes of Health*, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами были изучены закономерности одновременного встраивания в ДНК нуклеотидов пиримидиновой природы при полном замещении соответствующих природных dNTPs [12]. Было показано, что производные с менее объемными функциональными группами являются лучшими субстратами для ДНК-полимераз. Вероятно, в случае применения электронейтральных модифицирующих групп основную роль играют стерические факторы при образовании каталитически активной «закрытой»

конформации ДНК-полимеразы при образовании комплекса с субстратом [14, 15, 16].

В настоящей работе исследовали субстратные свойства модифицированных трифосфатов дезоксинуклеозидов (mod-dUTP, mod-dCTP, mod-dATP) с расширенным набором ДНК-полимераз. Выбор модификаций, введенных в гетероциклические основания соединений, обусловлен стремлением обеспечить структурные различия в совокупности с возможностью создания пар с аналогичными модификациями. Нуклеотиды пуриновой и пиримидиновой природы с аналогичными модификациями не могут рассматриваться как полные аналоги, но их сравнение представляет интерес для выявления закономерностей влияния модифицирующих групп.

Структуры использованных соединений приведены на рис. 1.

Проводили реакции ПЦР и PEX при полном замещении dTTP, dCTP и dATP, используя различные попарные сочетания модифицированных производных. Создавали пары dU + dC, dU + dA, dC + dA с различными или одинаковыми модификациями.

В качестве матрицы для ПЦР применяли комбинаторную ДНК-библиотеку, которая использовалась нами ранее в получении аптамера с помощью SELEX [17], поскольку субстратное поведение модифицированных субстратов полимераз с такими матрицами представляет особый интерес для получения аптамеров с новыми свойствами (рис. 2). Самым сложным субстратом для всех полимераз оказался dA с метильным заместителем (dAm). Для этого субстрата удалось получить продукт только с помощью полимеразы Deep Vent, но при этом было получено большое количество неполноразмерных продуктов. При одновременном встраивании dC (dCm) и dA (dAm), имеющих метильные заместители, наблюдали образование полноразмерного продукта.

С использованием Taq-полимеразы ни с одним из выбранных модифицированных дезоксинуклеозидтрифосфатов не удалось получить полноразмерных продуктов, кроме варианта с сочетанием пропинильного dU (dUp) и метильного dA (dAm). Образовались как полноразмерный, так и неполноразмерный продукты. Полимераза KOD XL ни с одним из используемых модифицированных субстратов не образовала полноразмерный продукт, кроме dUp, но и в этом случае наблюдали образование двух продуктов различной длины.

Vent (*exo*-) полимеразы в данном эксперименте показала себя как наиболее эффективный фермент для всех выбранных сочетаний, кроме dAm. С этим субстратом не удалось получить продукт, но в сочетании с dCp и dUp воспроизводимо образовывались полноразмерные продукты с высокой эффективностью, рассчитанной по результатам ПЦР в режиме реального времени.

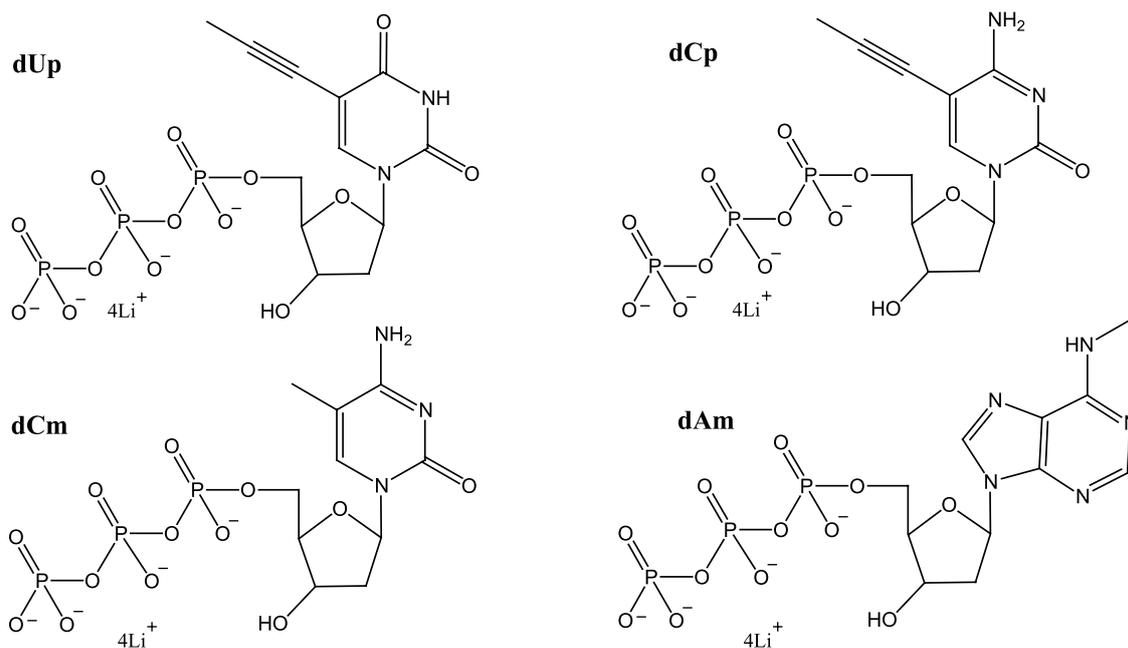


Рис. 1. Модифицированные трифосфаты дезоксиуридина, дезоксицитидина и дезоксиаденозина. dUp и dCp – производные, содержащие 5-пропинил, dCm и dAm – производные, содержащие метильную группу в 5 и N⁶ положении, соответственно.

Fig. 1. Modified triphosphates of deoxyuridine, deoxycytidine, and deoxyadenosine. dUp and dCp are derivatives containing 5-propynyl; dCm and dAm are derivatives containing a methyl group in the 5 and N⁶ positions, respectively.

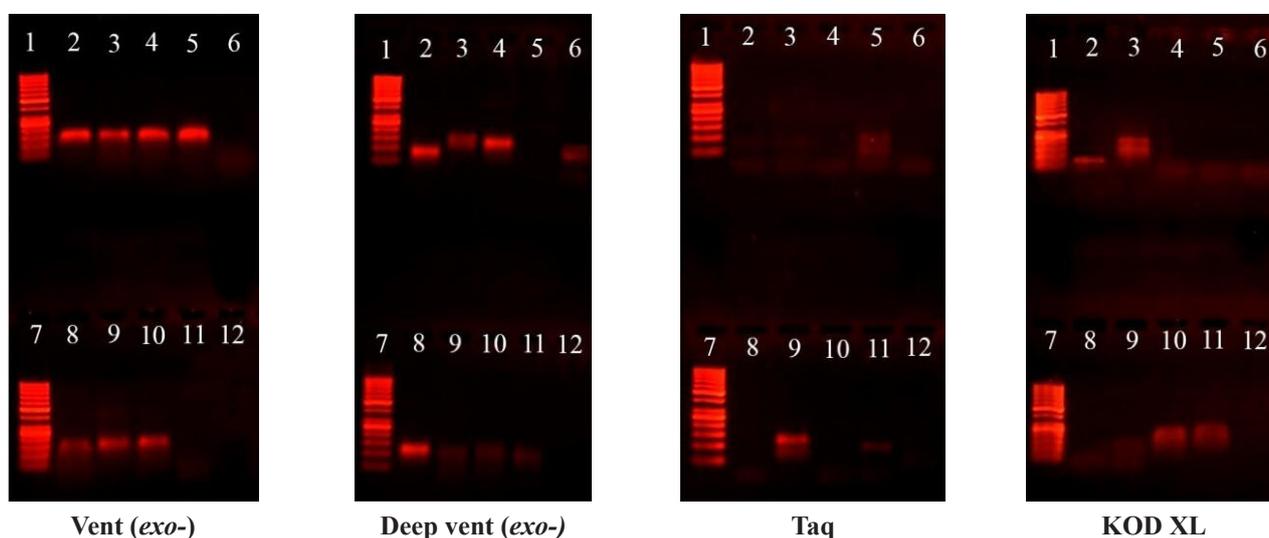


Рис. 2. Электрофоретический анализ ПЦР с применением различных ДНК-полимераз и комбинаторной ДНК-библиотеки.

На каждом рисунке: (1) и (7) – маркеры длин продуктов GeneRuler 50 bp; (2) – dT + dC; (3) – dUp; (4) – dCp; (5) – dCm; (6) – dAm; (8) – dUp + dCp; (9) – dUp + dAm; (10) – dCp + dAm; (11) – dCm + dAm; (12) – отрицательный контроль.

Fig. 2. Polymerase chain reaction electrophoretic analysis using different DNA polymerases and a DNA library.

In each figure: (1) and (7) are GeneRuler 50bp DNA ladder, (2) dT + dC, (3) dUp, (4) dCp, (5) dCm, (6) dAm, (8) dUp + dCp, (9) dUp + dAm, (10) dCp + dAm, (11) dCm + dAm, and (12) negative control.

Анализ методом ПЦР показывает, что наиболее сложными субстратами для всех использованных полимераз являются модифицированные производные, имеющие метильный заместитель. Интересно, что использование сочетания трифосфатов с пропилильным и метильным заместителями показывает лучшую субстратную эффективность, чем использование производных только с метильным заместителем. Также следует отметить, что полимеразы лучше воспринимают субстраты, имеющие пиримидиновую природу.

Для изучения индивидуального и одновременного встраивания dU и dC в одну растущую цепь ДНК методом PEX, нами были синтезированы искусственные матричные олигонуклеотиды [12]. В целях изучения закономерностей встраивания модифицированных дезоксиаденинов (нуклеотиды пуриновой природы), к имеющимся синтетическим матрицам сконструированы дополнительные (последовательности указаны в экспериментальной части), направленные на изучение множественного последовательного встраивания модифицированных dA как в индивидуальном виде, так и в паре с разноименными модифицированными нуклеотидами типа dU.

Матрица M1A предназначена для изучения индивидуального встраивания модифицированных dA последовательно 1, 2, 3 и 4 раза в процессе удлинения праймера по матричной цепи. Проведение PEX позволяет оценить эффективность

множественного последовательного встраивания mod-dA. Видно, что спейсерные участки матрицы не содержат комплементарных дезоксиаденину нуклеотидов (dT). Кроме того, для сравнения с результатами попарного встраивания с dU (на матрицах M2UA и M2AU), спейсерные участки также не содержат dA.

Матрицы M2UA и M2AU предназначены для изучения множественного попарного встраивания dA и dU в различных последовательностях, что отражено в названиях матричных олигонуклеотидов.

В PEX с синтетическими матрицами (рис. 3) Taq и Vent (*exo-*) и Deep Vent-полимеразы показали способность встраивать как дезоксиуридин с пропилильным заместителем, так и дезоксиаденозин с метильным заместителем. В случае использования KOD XL-полимеразы образовались продукты, несколько различные по подвижности, предположительно не вполне соответствующие теоретической длине полноразмерного продукта. Это может быть связано с особенностью подвижности модифицированных продуктов в геле.

Показано, что при использованных условиях и для изученных пар модифицированных субстратов PEX приводит к образованию целевых продуктов с большей эффективностью, по сравнению с ПЦР. Это связано с медленной кинетикой встраивания модифицированных субстратов по сравнению с природными олигонуклеотидами, и, следовательно, преимущество PEX заключается

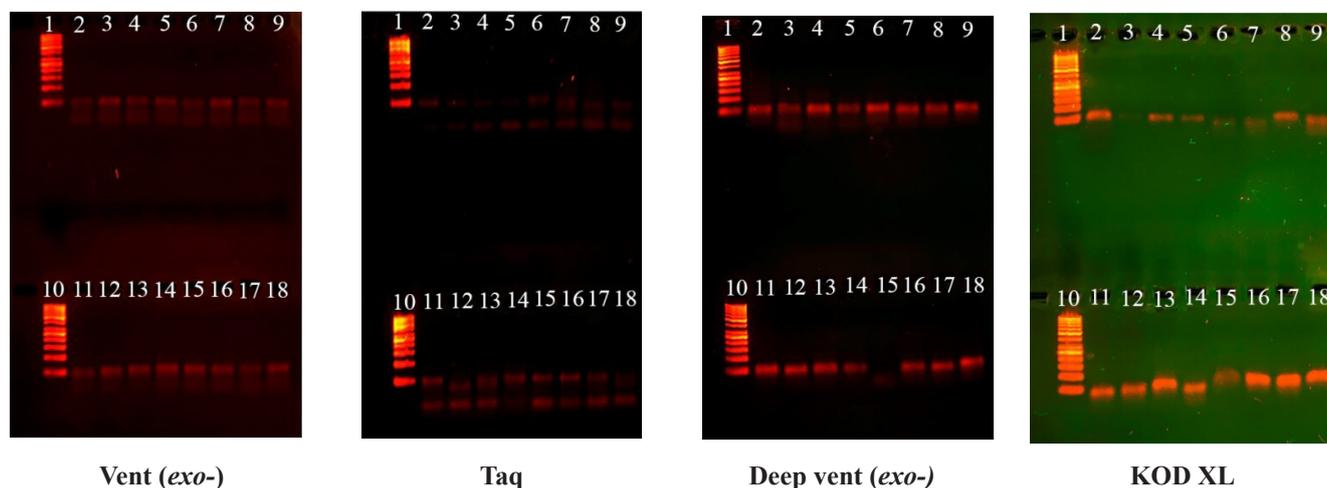


Рис. 3. Электрофоретический анализ PEX с различными ДНК-полимеразами и специально сконструированными синтетическими матрицами.

На каждом рисунке: (2–5) – матрица M1U; (6–9) – матрица M1A; (11–14) – матрица M2UA; (15–18) – матрица M2AU; (1) и (10) – маркеры длин для продуктов GeneRuler 50 bp; (2), (6), (11) и (15) – dT + dA; (3), (7), (12) и (16) – dUp; (4), (8), (13) и (17) – dAm; (5), (9), (14) и (18) – dUp + dAm.

Fig. 3. PEX electrophoretic analysis with various DNA polymerases and specially designed templates. In each figure: (2–5) matrix M1U; (6–9) matrix M1A; (11–14) matrix M2UA; (15–18) matrix M2AU; (1) and (10) length marker for GeneRuler products 50 bp; (2, 6, 11, and 15) dT + dA; (3, 7, 12, and 16) dUp; (4, 8, 13, and 17) dAm; (5, 9, 14, and 18) dUp + dAm.

в длительности времени элонгации (существенно выше, чем в ПЦР). Результаты хорошо коррелируют с полученными ранее данными [12] и мировой практикой применения РЕХ для получения модифицированных аптамеров [18].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Субстратная эффективность модифицированных соединений, использованных в данном исследовании, зависит от химической природы модификации (массивные либо компактные заместители), природы использованного нуклеотида (пуриновые либо пиримидиновые основания) и варьирует для разных ДНК-полимераз. Кроме того, существенное влияние на образование полноразмерных модифицированных продуктов оказывает используемая ферментативная реакция. Так, реакция удлинения праймера, благодаря длительному времени элонгации (удлинения), имеет преимущество перед ПЦР.

Таким образом, из протестированных соединений наибольшую эффективность показали модифицированные dU и dC (то есть, нуклеотиды пиримидиновой природы) в сочетании с Vent (*exo*-) ДНК-полимеразой.

В результате работы получены ДНК, модифицированные одновременно парами производных нуклеотидов как пуриновой, так и пиримидиновой природы. Проведенные исследования имеют важное значения для получения ДНК с множественными модификациями, в том числе для создания аптамеров нового поколения.

Благодарности

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-04-01217.

Acknowledgments

The study was supported by the Russian Foundation for Basic Research, grant No. 19-04-01217.

Вклад авторов

О.С. Волкова – проведение исследований, подготовка рукописи;

А.В. Чудинов – научное консультирование;

С.А. Лапа – планирование экспериментов, редактирование рукописи.

Authors' contribution

O. S. Volkova – conducting research, preparation of the manuscript;

A.V. Chudinov – academic advising;

S.A. Lapa – design of experiments, editing the manuscript.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflicts of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Lee K., Rafi M., Wang X., Aran K., Feng X., Lo Sterzo C., et al. In vivo delivery of transcription factors with multifunctional oligonucleotides. *Nat. Mater.* 2015;14(7):701–706. <https://doi.org/10.1038/nmat4269>
2. Smith C.I.E., Zain R. Therapeutic oligonucleotides: state of the art. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2019;59:605–630. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010818-021050>
3. Wandtke T., Wozniak J., Kopinski P. Aptamers in diagnostics and treatments of viral infections. *Viruses.* 2015;7(2):751–780. <https://doi.org/10.3390/v7020751>
4. Peinetti A.S., Cereratti H., Mizrahi M., Gonzales G.A., Ramires S.A., Requejo F., et al. Confined gold nanoparticles enhance the detection of small molecules in label free impedance aptasensors. *Nanoscale.* 2015;7:7763–7769. <https://doi.org/10.1039/C5NR01429H>
5. Faltin B., Zengerle R., von Stetten F. Current methods for fluorescence-based universal sequence-dependent detection of nucleic acids in homogenous assays and clinical applications. *Clin. Chem.* 2013;59 (11):1567–1582. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2013.205211>

6. Maier K.E., Levy M. From selection hits to clinical leads progress in aptamer discovery. *Mol. Ther. Methods & Clin. Develop.* 2016;5:16014. <https://doi.org/10.1038/mtm.2016.14>

7. Hocek M. Synthesis of base-modified 2'-deoxyribonucleoside triphosphates and their use in enzymatic synthesis of modified DNA for applications in bioanalysis and chemical biology. *J. Org. Chem.* 2014;79(21):9914–992. <https://doi.org/10.1021/jo5020799>

8. Kutuyavin I.V. Use of base-modified duplex-stabilizing deoxynucleoside 5'-triphosphates to enhance the hybridization properties of primers and probes in polymerase chain reaction. *Biochemistry.* 2008;47(51):13666–13673. <https://doi.org/10.1021/bi8017784>

9. Rohloff J.C., Gelinas A.D., Jarvis T.C., Ochsner U.A., Schneider D.J., Gold L., Janjic N. Nucleic Acid Ligands with Protein-like Side Chains: Modified Aptamers and Their Use as Diagnostic and Therapeutic Agents. *Mol. Ther. Nucleic Acids.* 2014;3(10):e201. <https://doi.org/10.1038/mtna.2014.49>

10. Tolle F., Mayer G. Dressed for success – applying chemistry to modulate aptamer functionality. *Chem. Sci.* 2013;4(1):60–67. <https://doi.org/10.1039/c2sc21510a>

11. Gawande B.N., Rohloff J.C., Carter J.D., von Carlowitz I., Zhang C., Schneider D.J., Janjic N. Selection of DNA aptamers with two modified bases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2017;114(11):2898–2903. <https://doi.org/10.1073/pnas.1615475114>

12. Чудинов А.В., Шершов В.Е., Павлов А.С., Волкова О.С., Кузнецова В.Е., Заседателев А.С., Лапа С.А. Одновременное встраивание модифицированных производных dU и dC в растущую цепь ДНК в реакции удлинения праймера и ПЦР. *Биорг. химия.* 2020;46(5):546–549. <https://doi.org/10.31857/S0132342320050061>

[Chudinov A.V., Shershov V.E., Pavlov A.S., Volkova O.S., Kuznetsova V.E., Zasedatelev A.S., Lapa S.A. Simultaneous incorporation of modified dU and dC derivatives in the growing DNA chain using PEX and PCR. *Bioorg. Khimiya = Bioorg. Chemistry.* 2020;46(5):546–549 (in Russ.). <https://doi.org/10.31857/S0132342320050061>]

13. Лапа С.А., Ромашова К.С., Спицын М.А., Шершов В.Е., Кузнецова В.Е., Гусейнов Т.О., Заседателева О.А., Радко С.П., Тимофеев Э.Н., Лисица А.В., Чудинов А.В. Получение модифицированных комбинаторных ДНК-библиотек методом ПЦР в обратной эмульсии с последующим разделением цепей. *Молекулярная биология.* 2018;52(6):984–996. <https://doi.org/10.1134/S0026898418060113>

[Lapa S.A., Romashova K.S., Spitsyn M.A., Shershov V.E., Kuznetsova V.E., Guseinov T.O., Zasedateleva O.A., Radko S.P., Timofeev E.N., Lisitsa A.V., Chudinov A.V. Preparation of modified combinatorial DNA libraries via emulsion PCR with subsequent strand separation. *Mol. Biol.* 2018;52(6):854–864. <https://doi.org/10.1134/S0026893318060110>]

[Original Russian Text: Lapa S.A., Romashova K.S., Spitsyn M.A., Shershov V.E., Kuznetsova V.E., Guseinov T.O., Zasedateleva O.A., Radko S.P., Timofeev E.N., Lisitsa A.V., Chudinov A.V. Preparation of modified combinatorial DNA libraries via emulsion PCR with subsequent strand separation. *Molekulyarnaya Biologiya.* 2018;52(6):984–996 (in Russ.). <https://doi.org/10.1134/S0026898418060113>]

14. Berman A.J., Kamtekar S., Goodman J.L., Lázaro de Vega M., Blanco L., Salas M., Steitz T.A. Structures of phi29 DNA polymerase complexed with substrate: the mechanism of translocation in B-family polymerases. *EMBO J.* 2007;26(14):3494–3505. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601780>

Об авторах:

Волкова Ольга Сергеевна, лаборант, ФГБУН Институт молекулярной биологии РАН им. В.А. Энгельгардта (119991, Россия, Москва, ул. Вавилова, д. 32). E-mail: olechka.volckowa@yandex.ru. <https://orcid.org/0000-0003-1328-771X>

Чудинов Александр Васильевич, к.х.н., заведующий лабораторией, ФГБУН Институт молекулярной биологии РАН им. В.А. Энгельгардта (119991, Россия, Москва, ул. Вавилова, д. 32). E-mail: chud@eimb.ru. Scopus Author ID 7003833018, <https://orcid.org/0000-0001-5468-4119>

Лапа Сергей Анатольевич, к.б.н., научный сотрудник, ФГБУН Институт молекулярной биологии РАН им. В.А. Энгельгардта (119991, Россия, Москва, ул. Вавилова, д. 32). E-mail: lapa@biochip.ru. Scopus Author ID 6603461000, <https://orcid.org/0000-0002-9011-134X>

About the authors:

Olga S. Volkova, Laboratory Assistant, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences (32, Vavilova ul., Moscow, 119991, Russia). E-mail: olechka.volckowa@yandex.ru. <https://orcid.org/0000-0003-1328-771X>

Alexander V. Chudinov, Cand. Sci. (Chem.), Head of the Laboratory, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences (32, Vavilova ul., Moscow, 119991, Russia). E-mail: chud@eimb.ru. Scopus Author ID 7003833018, <https://orcid.org/0000-0001-5468-4119>

Sergey A. Lapa, Cand. Sci. (Biol.), Researcher, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences (32, Vavilova ul., Moscow, 119991, Russia). E-mail: lapa@biochip.ru. Scopus Author ID 6603461000, <https://orcid.org/0000-0003-1328-771X>

Поступила: 20.02.2021; получена после доработки: 12.03.2021; принята к опубликованию: 02.04.2021.

The article was submitted: February 20, 2021; approved after reviewing: March 12, 2021; accepted for publication: April 02, 2021.