



ОЦЕНКА СТАБИЛЬНОСТИ КОМПЛЕКСОВ ДНК-ПОЛИМЕРАЗЫ KLENТАQ С ДЕЗОКСИЦИТИДИНТРИФОСФАТОМ В ПРИСУТСТВИИ КАТИОНОВ ДВУХВАЛЕНТНЫХ МЕТАЛЛОВ

Купова О.Ю.^{1,2}, Сахабутдинова А.Р.¹, Ханова Л.И.¹, Чемерис А.В.¹, Гарафутдинов Р.Р.¹

¹Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Россия, 450054, Уфа, Проспект Октября 71, E-mail: garafutdinovr@mail.ru

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Уфимский государственный нефтяной технический университет», Россия, 450064, г. Уфа, ул. Космонавтов, д. 1.

Резюме

ДНК-полимеразы являются необходимым компонентом реакций синтеза цепей ДНК. Для своей работы они требуют присутствия в реакционной смеси катионов двухвалентных металлов. Наиболее типичным кофактором является ион Mg^{2+} , однако имеются данные о проявлении некоторыми ДНК-полимеразами своей полимеразной активности и в присутствии иных катионов. Ранее такие данные были получены преимущественно для ДНК-полимераз, не обладающих цепь-вытесняющей активностью. В данной работе с помощью молекулярного докинга изучены четвертичные комплексы, содержащие ДНК, трифосфат, катионы Ca^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} или Zn^{2+} в разных сочетаниях и полимеразу KlenTaq, способную вытеснить старую цепь при синтезе новой. Определены энергетические параметры комплексов, а также позиции и типы химических связей в них. Обнаружено, что максимальное число ионных связей образуется при наличии в системе сочетаний ионов Mg^{2+}/Cd^{2+} и Mg^{2+}/Mg^{2+} .

Ключевые слова: нуклеиновые кислоты, амплификация, ДНК-полимеразы, кофакторы, молекулярный докинг, молекулярное моделирование

Цитирование: Купова О.Ю., Сахабутдинова А.Р., Ханова Л.И., Чемерис А.В., Гарафутдинов Р.Р. Оценка стабильности комплексов ДНК-полимеразы KlenTaq с дезоксицитидинтрифосфатом в присутствии катионов двухвалентных металлов // *Biomics*. 2022. Т.14(4). С. 368-377. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2022-39

© Авторы

EVALUATION OF THE STABILITY OF COMPLEXES FORMED BY KLENТАQ DNA POLYMERASE AND DEOXYCYTIDINETRIPHOSPHATE IN THE PRESENCE OF DIVALENT METAL CATIONS

Kupova O.Yu.^{1,2}, Sakhabutdinova A.R.¹, Khanova L.I.¹, Chemeris A.V.¹, Garafutdinov R.R.¹

¹Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, prospect Oktyabrya, 71, Ufa, 450054, Russia, e-mail: garafutdinovr@mail.ru

²Ufa State Petroleum Technological University, Russia, 450064, Ufa, st. Kosmonavtov, 1

Resume

DNA polymerases are a key component of DNA synthesis reactions. For their functioning, the presence of divalent metal cations in the reaction mixture is required. The most typical cofactor is the Mg^{2+} ion; however,

there are data on the manifestation of polymerase activity by some DNA polymerases in the presence of other cations. Previously, such data were obtained mainly for DNA polymerases that do not have strand-displacement activity. In this study, quaternary complexes containing DNA, triphosphate, Ca^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , or Zn^{2+} cations in various combinations, and KlenTaq polymerase, which is able to displace the old strand during the synthesis of a new one, were studied using molecular docking. The energy parameters of the complexes, as well as the positions and types of chemical bonds, were determined. It was found that the maximum number of ionic bonds is formed in the presence of cation combinations $\text{Mg}^{2+}/\text{Cd}^{2+}$ and $\text{Mg}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ions.

Keywords: nucleic acids, amplification, DNA polymerases, cofactors, molecular docking, molecular modeling

Citation: Kupova O.Yu., Sakhabutdinova A.R., Khanova L.I., Chemeris A.V., Garafutdinov R.R. Evaluation of the stability of complexes formed by KlenTaq DNA polymerase with deoxycytidine triphosphate in the presence of divalent metal cations. *Biomcs.* 2022. V.14(4). P. 368-377. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2022-39 (In Russian)

© Authors

Введение

Детекция специфичных фрагментов нуклеиновых кислот (НК) является основой современных методов молекулярной диагностики различных заболеваний [Burtis et al., 2013], анализа объектов окружающей среды [Portenko et al., 2013] и продуктов питания [Broeders et al., 2012], вносит важный вклад при проведении расследований в экспертно-криминалистической деятельности [Чемерис и др., 2022]. Как правило, детекцию осуществляют с помощью амплификации НК *in vitro*, позволяющей многократно увеличить количество исходной НК-мишени до уровня, обеспечивающего ее уверенное обнаружение инструментальными методами. Наиболее используемым методом амплификации является полимеразная цепная реакция (ПЦР), характеризующаяся значительными возможностями при относительной простоте, высокой чувствительности, надежности и низкой себестоимости. Сразу после появления ПЦР около 30 лет назад [Saiki et al., 1985] стали предлагаться различные варианты проведения данной реакции [Чемерис и др., 2011; Гарафутдинов и др., 2015; Garafutdinov et al., 2017] и способы детекции результатов [Бикбулатова и др., 2012], в том числе направленные на повышение специфичности реакции [Чемерис и др., 2012a; Чемерис и др., 2012b].

Хорошей альтернативой ПЦР являются методы изотермической амплификации, характеризующиеся высокой эффективностью благодаря бесперебойной и устойчивой работе ферментной системы. Они нередко обладают большей специфичностью и чувствительностью и, главное, не требуют дорогостоящего оборудования для термоциклирования, что позволяет использовать для их проведения портативные устройства, в том числе функционирующие в формате lab-on-chip. На

сегодняшний день предложено множество методов изотермической амплификации ДНК и РНК: LAMP - петлевая изотермическая амплификация (Loop mediated AMPLification) [Notomi et al., 2000], NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification) [Compton, 1991], SDA - (Strand Displacement Amplification) [Walter, Strunk, 1994], RCA (AKK) - амплификация катящимся кольцом (Rolling Circle Amplification) [Fire, Xu, 1995] и другие. АКК является наиболее гибким из указанных методов [Гарафутдинов и др., 2021].

Все методы изотермической амплификации требуют использования полимераз с цепь-вытесняющей активностью, т.е. способных обеспечить эффективное расхождение цепей нуклеиновых кислот при постоянной температуре: фрагмент Кленова, phi29, Vent *exo*⁻, Bst *exo*⁻ и другие. Однако оказалось, что такие полимеразы часто дают неспецифические продукты, которые могут нарабатываться в отсутствие матрицы и праймеров (путем *ab initio* синтеза [Zyrina, Antipina, 2014; Ханова и др. (Khanova et al.) 2022]) или за счет мультимеризации [Garafutdinov et al., 2020a]. Были предложены несколько способов устранения мультимеризации [Garafutdinov et al., 2020b; Сахабутдинова и др., 2020; Sakhabutdinova et al., 2021].

Все известные полимеразы требуют ионов двухвалентных металлов для реакции переноса нуклеотидов. Несмотря на то, что Mg^{2+} является наиболее универсальным кофактором, некоторые полимеразы могут использовать и другие катионы, однако скорость и точность включения нуклеотидов в этом случае снижаются и может проявляться необычная активность. Так, замена Mg^{2+} на Mn^{2+} описана для многих полимераз [Vashishtha et al., 2016]. Хотя Mn^{2+} обладает высоким мутагенным эффектом из-за включения неправильных нуклеотидов, он широко используется, например, для усиления

обратно-транскриптазной активности у Tth [Myers, Gerald, 1991]. Полимеразы Dpo4 и PabPolB активируются ионами Ca^{2+} [Ralec et al., 2017]. Было показано, что полноразмерная Bst-полимераза может использовать Mn^{2+} , Co^{2+} и Cd^{2+} в качестве альтернативных кофакторов [Vashishtha et al., 2018], а ее большой фрагмент - Mn^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} и Cd^{2+} [Garafutdinov et al., 2020c; Garafutdinov et al., 2020d]. Целью работы стало выявление теоретической способности полимеразы KlenTaq использовать катионы двухвалентных металлов для синтеза ДНК.

Методы исследования

Для исследования была выбрана из базы данных PDB структура 6q4v ДНК-полимеразы KlenTaq. Молекулярную структуру этой полимеразы дополнительно готовили для расчетов с помощью программы Protein Preparation Wizard из пакета Schrodinger Maestro Suite 2016-4 [Sastrу et al., 2013]: были устранены все несоответствия, такие как отсутствие атомов водорода, порядок связей и неправильная ориентация функциональных групп боковой цепи. Молекулы воды в активном центре, а также молекулы ДНК и дСТР остались без изменений. Проводилось моделирование четвертичных комплексов (полимераза-ДНК-трифосфат-катионы), включавших катионы Ca^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} и Zn^{2+} , помещенные в позиции А и В исходной структуры, и дальнейшая оптимизация структуры (ограниченная минимизация по всем атомам). Молекулярный докинг проводили

непосредственно с помощью программы Schrodinger Suite 2016-4. Комплексы рассчитывали с помощью модуля Glide Docking [Friesner et al., 2006] пакета Schrodinger Suite 2016-4.

Результаты и обсуждение

Считается, что для реакции переноса нуклеотида полимеразам требуются два [Steitz, 1998] или три [Yang et al., 2016] двухвалентных катиона, но в настоящее время все же считается справедливым механизм с двумя катионами [Tsai, 2019]. Очевидно, что тип кофактора оказывает влияние на пространственные и конформационные изменения комплекса ДНК-полимераза-субстрат и, как следствие, на эффективность синтеза ДНК.

Для моделирования нами была выбрана структура 6q4v ДНК-полимеразы KlenTaq. Ионы металлов помещали в позиции А и В исходной структуры фермента с последующей ее оптимизацией. Молекулярный докинг был проведен для четвертичных комплексов, содержащих полимеразу, ДНК, трифосфат и катионы Ca^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} или Zn^{2+} , т.е. для структур, имитирующих реакционный комплекс в момент присоединения трифосфата (рис. 1А). В качестве субстрата был взят дезоксицитидинтрифосфат (дСТР). Оптимизированные комплексы были визуализированы как 2D-изображения в виде диаграмм взаимодействия лигандов (ДВЛ), показывающих взаимодействия между ДНК и активным сайтом фермента (рис. 1Б).

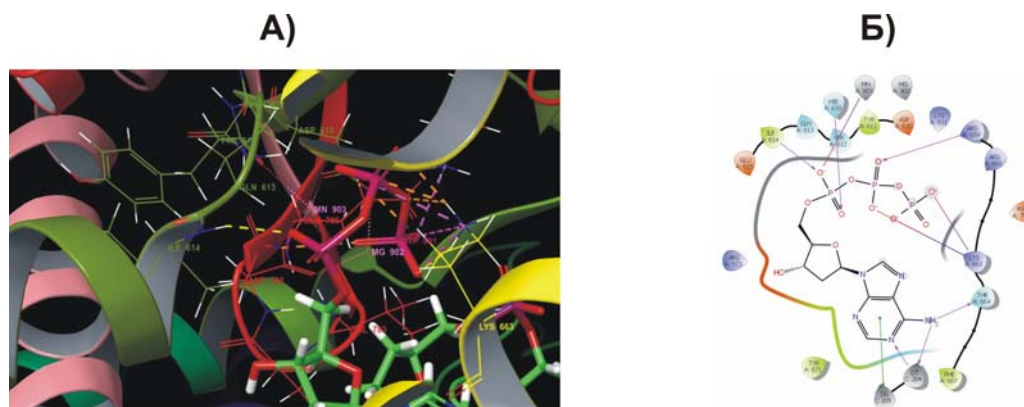


Рис. 1. Примеры молекулярной структуры четвертичного комплекса (А) и диаграммы взаимодействия лигандов (Б) для ДНК-полимеразы KlenTaq с трифосфатом в присутствии ионов марганца и магния.

Fig. 1. Examples of the molecular structure of the quaternary complex (A) and ligand interaction diagrams (B) for KlenTaq DNA polymerase with triphosphate in the presence of manganese and magnesium ions.

Аминокислоты представлены на ДВЛ как сферы, окрашенные согласно их химическим свойствам. Взаимодействия между аминокислотами и лигандами показаны цветными линиями и стрелками в

зависимости от типа взаимодействия. ДВЛ не показывают расстояние между лигандом и рецептором и используются только для отображения количества и типа связей. Ключевым компонентом

комплексов является трифосфат, который связывается ионными (солевой мостик, sb) и водородными (h) связями, а также за счет слабых взаимодействий (π - π) с окружением: аминокислотами, ДНК, катионами и водой. Молекулярный докинг был проведен для всех возможных вариантов попарных сочетаний катионов (64 варианта) и получены соответствующие ДВЛ для всех четвертичных комплексов. Анализ ДВЛ позволил определить энергетические параметры комплексов, а также позиции и типы химических связей в них (табл. 1).

Центральным компонентом комплексов «полимераза-ДНК-трифосфат-катионы» является молекула трифосфата, которая связывается ионными и водородными связями с окружением: аминокислотами, катионами и ДНК. ДВЛ показали, что трифосфат связывается водородными и ионными связями с несколькими аминокислотами, а также водородными связями и π - π -взаимодействиями (стэкинг-взаимодействие) с ДНК. Катионы взаимодействуют с атомами кислорода только α - и γ -фосфатных остатков трифосфата. Активный центр также содержит две или три молекулы воды, которые связываются водородными связями с аминокислотами, трифосфатом и ДНК.

Простой подсчет общего числа химических связей в комплексах позволил определить относительные величины R, характеризующие устойчивость полученных структур. Данный показатель варьировал в диапазоне 14-20 единиц. Сочетания катионов, для которых найдены наиболее высокие значения R, выделены в таблице серым цветом. Максимальные значения получены для сочетаний Ca^{2+}/Ca^{2+} и Ca^{2+}/Cu^{2+} (R=20). Однако для "классического" варианта (Mg^{2+}/Mg^{2+}) значение R составило лишь 16 единиц. При подсчете количества ионных связей "лидирующим" оказалось сочетание Mg^{2+}/Cd^{2+} (R=12), а вариант Mg^{2+}/Mg^{2+} расположился на втором месте (R=11). Также высокие значения R получены для комплексов, содержащих хотя бы один ион Ca^{2+} , Cd^{2+} и Ni^{2+} . Последние катионы крайне нетипичны в качестве кофакторов.

Нельзя исключать, что подходы *in silico* на данный момент еще не способны учитывать все факторы, оказывающие влияние на стабильность и функционирование комплексов полимераз с ДНК. Так, гибкость молекулы фермента может быть переоценена (завышена) при замене одного катиона на другой. Возможно также влияние третьего катиона, который, согласно трехкатионному механизму, играет важную роль в переносе нуклеотида и содействует быстрому удалению пирофосфата. Несомненно, требуется экспериментальная проверка полученных расчетных данных.

Таблица 1. Энергетические параметры и позиции химического взаимодействия в комплексах ДНК-полимеразы KlenTaq с катионами металлов (sb - ионные взаимодействия, h - водородные связи, pi - π - π -связи, + - прочие слабые взаимодействия)

Table 1. Energy parameters and positions of chemical interactions in complexes of KlenTaq DNA polymerase with metal cations (sb - ionic interactions, h - hydrogen bonds, pi - π - π -bonds, + - other weak interactions)

позиции	Энергетические параметры				связывание трифосфата с										связывание H ₂ O с		общее количество связей		R			
	A	B	Potential Energy	docking score	glide emodel	ДНК	Me A	Me B	R573	Q613	I614	E615	H639	R659	K663	W664	K831	dCTP		a/k	H	SB
Ca	Ca	Ca	-3186.350	-13.170	-146.467	2h,2pi	4sb	2sb	1h	1h	1h	+	1h	1sb,1h	2sb,1h	+	1h	1h	2h	11	9	20
Cd	Ca	Ca	-3184.016	-11.978	-171.912	2pi	4sb	2sb	1h	+	1h	+	1h	1sb,1h	2sb,1h	1h				6	9	15
Co	Ca	Ca	-3184.282	-11.779	-170.414	2pi	4sb	2sb	1h	+	1h	+	1h	1sb,1h	2sb,1h	1h				6	9	15
Cu	Ca	Ca	-3184.470	-11.514	-169.777	2pi	4sb	2sb	1h	1h	1h	+	1h	1sb,1h	2sb,1h	1h				7	9	16
Mg	Ca	Ca	-3184.617	-11.616	-195.604	1h,2pi	4sb	2sb	1h	1h	1h	+	1h	1sb,1h	2sb,1h	1h				8	9	17

Таблица 1, продолж. / Table 1, cont.

Mn	Ca	-3183.593	-11.645	-174.079	2pi	4sb	2sb	1h	1h	1h	1h	1h	1h	1h	1sb,1h	3sb	1h				6	10	16	
Ni	Ca	-3184.234	-11.667	-152.408	2h,2pi	4sb	2sb	+	1h	1h	1h	1h	1h	1h	2h	3sb	+	1sb	1h	1h		9	10	19
Zn	Ca	-3183.857	-11.191	-169.637	1h,2pi	4sb	1sb	1h	1h	1h	1h	1h	1h	1h	2sb	2sb	1h					7	9	16
Ca	Cd	-3184.187	-11.519	-167.520	2pi	4sb	2sb	1h	1h	1h	1h	1h	1h	1h	1sb,1h	3sb	1h					6	10	16
Cd	Cd	-3182.348	-13.923	-158.849	2h,2pi	4sb	2sb	+	1h	1h	1h	1h	1h	1h	1sb,1h	3sb	+		1h	1h		8	10	18
Co	Cd	-3182.649	-14.195	-159.732	2h,2pi	4sb	2sb	1h	1h	1h	1h	1h	1h	1h	1sb,1h	2sb,1h	+		1h	1h		10	9	19
Cu	Cd	-3182.014	-13.739	-156.968	2h,2pi	4sb	1sb	1h	1h	1h	1h	1h	1h	1h	2sb	2sb	+		1h	1h		8	9	17
Mg	Cd	-3181.739	-11.403	-191.374	2pi	4sb	2sb	1h	1h	1h	1h	1h	1h	1h	1sb,1h	3sb	1h					7	10	17
Mn	Cd	-3182.323	-11.180	-171.643	1h,3pi	4sb	2sb	1h	1h	1h	1h	1h	1h	1h	1sb,1h	2sb,1h	1h					8	9	17
Ni	Cd	-3182.409	-14.076	-165.995	2h,2pi	4sb	2sb	1h	1h	1h	1h	1h	1h	1h	1sb,1h	3sb	+		1h	1h		9	10	19
Zn	Cd	-3182.439	-11.903	-167.127	2h,2pi	4sb	2sb	1h	1h	1h	1h	1h	1h	1h	1sb,1h	3sb	+		1h	1h		9	10	19
Ca	Mg	-3184.147	-11.625	-174.308	2pi	4sb	1sb	1h	1h	1h	1h	1h	1h	1h	2sb	2sb	1h					6	9	15
Cd	Mg	-3182.333	-12.502	-165.130	2h,2pi	4sb	3sb	+	1h	1h	1h	1h	1h	1h	1sb	3sb	+	1sb	1h	1h		7	12	19
Co	Mg	-3183.060	-11.910	-173.721	2h,2pi	4sb	1sb	1h	+	1h	+	1h	+	1h	2sb	2sb	1h					6	9	15
Cu	Mg	-3182.975	-11.534	-164.094	1h,2pi	4sb	1sb	+	1h	1h	1h	1h	1h	1h	2sb	2sb	1h					5	9	14
Mg	Mg	-3183.111	-11.605	-187.549	1h,2pi	4sb	3sb	+	+	1h	+	+	1h	1h	2h	3sb	+	1sb				5	11	16
Mn	Mg	-3181.690	-14.140	-173.825	2h,2pi	4sb	1sb	1h	1h	1h	1h	1h	1h	1h	2sb	2sb	+		1h	1h		8	9	17
Ni	Mg	-3182.194	-11.657	-174.034	2pi	4sb	2sb	1h	1h	1h	1h	1h	1h	1h	1sb,1h	3sb	1h					6	10	16
Zn	Mg	-3183.324	-14.262	-167.619	2h,2pi	4sb	1sb	1h	1h	1h	1h	1h	1h	1h	2sb	2sb	+		1h	1h		8	9	17
Ca	Mn	-3184.622	-11.665	-157.804	1h,2pi	4sb	1sb	+	1h	1h	1h	1h	1h	1h	2sb	2sb	1h					5	9	14
Cd	Mn	-3181.375	-13.367	-160.267	2h,2pi	4sb	1sb	1h	1h	1h	1h	1h	1h	1h	2sb	2sb	+		1h	1h		8	9	17
Co	Mn	-3182.540	-14.187	-162.480	2h,2pi	4sb	2sb	+	1h	1h	1h	1h	1h	1h	1sb,1h	3sb	+		1h	1h		8	10	18
Cu	Mn	-3181.217	-13.305	-156.392	2h,2pi	4sb	2sb	1h	1h	1h	1h	1h	1h	1h	1sb,1h	2sb,1h	+		1h	1h		10	9	19
Mg	Mn	-3183.332	-11.527	-194.010	1h,2pi	4sb	1sb	1h	1h	1h	1h	1h	1h	1h	2sb	2sb	1h					6	9	15
Mn	Mn	-3182.957	-11.070	-168.773	1h,3pi	4sb	2sb	1h	1h	1h	1h	1h	1h	1h	1sb,1h	2sb,1h	1h					9	9	18
Ni	Mn	-3181.607	-11.760	-162.195	1h,2pi	4sb	1sb	1h	+	1h	1h	1h	1h	1h	2sb	2sb	1h					6	9	15
Zn	Mn	-3182.961	-11.452	-173.617	2pi	4sb	2sb	1h	1h	1h	1h	1h	1h	1h	1sb,1h	3sb	1h					6	10	16
Ca	Co	-3182.967	-11.571	-157.504	2pi	4sb	1sb	1h	1h	1h	1h	1h	1h	1h	2sb	2sb	1h					5	9	14
Cd	Co	-3182.413	-11.188	-161.689	1h,2pi	4sb	2sb	1h	1h	1h	1h	1h	1h	1h	1sb,1h	3sb	1h					7	10	17
Co	Co	-3181.461	-14.105	-165.662	2h,2pi	4sb	1sb	1h	1h	1h	1h	1h	1h	1h	2sb	2sb	+		1h	1h		8	9	17

Таблица 1, продолж. / Table 1, cont.

Cu	Co	-3181.162	-11.318	-164.611	2pi	4sb	2sb	1h	1h	1h	1h	1h	1h	1sb,1h	2sb,1h	1h			8	9	17
Mg	Co	-3181.853	-13.079	-190.886	2h,2pi	4sb	2sb	1h	1h	1h	1h	+	1h	1sb,1h	3sb	+	1h	2h	9	10	19
Mn	Co	-3182.707	-10.860	-164.401	1h,2pi	4sb	2sb	1h	1h	1h	1h	+	1h	1sb,1h	3sb	1h			7	10	17
Ni	Co	-3182.326	-11.761	-171.470	2pi	4sb	2sb	1h	1h	1h	1h	+	1h	1sb,1h	3sb	1h			7	10	17
Zn	Co	-3182.027	-11.412	-173.192	2pi	4sb	2sb	1h	1h	1h	1h	+	1h	1sb,1h	3sb	1h			6	10	16
Ca	Cu	-3184.060	-12.389	-157.078	2h,2pi	4sb	2sb	1h	1h	1h	1h	+	1h	1sb,1h	3sb	+	1h	2h	10	10	20
Cd	Cu	-3182.343	-13.377	-164.733	2h,2pi	4sb	2sb	1h	1h	1h	1h	+	1h	1sb,1h	3sb	+	1h	1h	9	10	19
Co	Cu	-3182.406	-11.990	-168.511	2h,2pi	4sb	1sb	1h	1h	1h	1h	+	1h	2sb	2sb	+	1h	2h	9	9	18
Cu	Cu	-3182.097	-11.692	-161.707	2pi	4sb	2sb	1h	1h	1h	1h	+	1h	1sb,1h	3sb	1h			6	10	16
Mg	Cu	-3182.552	-11.561	-186.372	2pi	4sb	1sb	1h	1h	1h	1h	+	1h	2sb	2sb	1h			5	9	14
Mn	Cu	-3182.281	-11.342	-170.933	2pi	4sb	2sb	1h	1h	1h	1h	+	1h	1sb,1h	2sb,1h	1h			8	9	17
Ni	Cu	-3182.391	-11.724	-173.598	2pi	4sb	2sb	1h	+	1h	1h	+	1h	1sb,1h	3sb	1h			5	10	15
Zn	Cu	-3182.739	-11.616	-171.401	1h,2pi	4sb	2sb	1h	1h	1h	1h	+	1h	1sb,1h	3sb	1h			7	10	17
Ca	Ni	-3183.664	-12.035	-161.986	2pi	4sb	2sb	1h	+	1h	1h	+	1h	1sb,1h	3sb	1h			5	10	15
Cd	Ni	-3182.324	-14.314	-164.266	2h,2pi	4sb	1sb	+	1h	1h	1h	+	1h	2sb	2sb	+	1h	1h	7	9	16
Co	Ni	-3181.804	-12.583	-169.503	2h,2pi	4sb	2sb	1h	1h	1h	1h	+	1h	1sb,1h	3sb	+	1h	1h	9	10	19
Cu	Ni	-3181.183	-11.017	-154.339	1h,3pi	4sb	1sb	1h	1h	1h	1h	+	1h	2sb	2sb	1h			7	9	16
Mg	Ni	-3181.866	-11.509	-191.382	1h,2pi	4sb	1sb	1h	1h	1h	1h	+	1h	2sb	2sb	1h			6	9	15
Mn	Ni	-3182.431	-11.651	-154.898	2h,2pi	4sb	2sb	1h	1h	1h	1h	+	1h	1sb,1h	3sb	1h			9	10	19
Ni	Ni	-3182.155	-14.215	-160.839	2h,2pi	4sb	2sb	1h	1h	1h	1h	+	1h	1sb,1h	2sb,1h	+	1h	1h	10	9	19
Zn	Ni	-3181.702	-11.410	-171.972	2pi	4sb	2sb	1h	1h	1h	1h	+	1h	1sb,1h	2sb,1h	1h			7	9	16
Ca	Zn	-3184.930	-11.613	-165.294	2pi	4sb	2sb	1h	+	1h	1h	+	1h	2sb,1h	2sb,1h	1h			6	10	16
Cd	Zn	-3182.659	-11.699	-167.852	2pi	4sb	2sb	1h	1h	1h	1h	+	1h	1sb,1h	2sb,1h	1h			7	9	16
Co	Zn	-3182.572	-14.534	-167.345	2h,2pi	4sb	2sb	1h	1h	1h	1h	+	1h	2sb	2sb	+	1h	1h	8	10	18
Cu	Zn	-3181.319	-11.260	-161.139	2pi	4sb	2sb	1h	1h	1h	1h	+	1h	1sb,1h	2sb,1h	1h			7	9	16
Mg	Zn	-3182.606	-11.075	-191.590	1h,2pi	4sb	2sb	1h	1h	1h	1h	+	1h	1sb,1h	2sb,1h	1h			9	9	18
Mn	Zn	-3182.653	-11.453	-169.388	2pi	4sb	2sb	1h	1h	1h	1h	+	1h	1sb,1h	2sb,1h	1h			7	9	16
Ni	Zn	-3182.567	-11.334	-175.983	2pi	4sb	2sb	1h	1h	1h	1h	+	1h	1sb,1h	3sb	1h			6	10	16
Zn	Zn	-3183.070	-11.428	-172.625	2pi	4sb	2sb	1h	1h	1h	1h	+	1h	1sb,1h	2sb,1h	1h			7	9	16

Благодарности

«Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-24-00235, <https://rscf.ru/project/22-24-00235/>.

Литература

1. Бикбулатова С.М., Чемерис Д.А., Никоноров Ю.М., Машков О.И., Гарафутдинов Р.Р., Чемерис А.В., Вахитов В.А. Способы детекции результатов полимеразной цепной реакции в режиме реального времени // Вестн. Башгосуниверситета. 2012. Т. 17. № 1. С. 59-67.
2. Гарафутдинов Р.Р., Галимова А.А., Сахабутдинова А.Р., Вахитов В.А., Чемерис А.В. ПЦР-амплификация ДНК с помощью праймеров "встык" // Мол. биол. 2015. Т. 49. № 4. С. 628. <https://doi.org/10.7868/S0026898415040059>
3. Гарафутдинов Р.Р., Сахабутдинова А.Р., Гильванов А.Р., Чемерис А.В. Амплификация нуклеиновых кислот "катящимся кольцом" – универсальный метод анализа широкого круга биологических мишеней // Биоорг. химия. 2021. Т. 47. № 6. С. 721-740. <https://doi.org/10.31857/S0132342321060075>
4. Сахабутдинова А.Р., Мирсаева Л.Р., Оскорбин И.П., Филипенко М.Л., Гарафутдинов Р.Р. Устранение мультимеризации ДНК, возникающей при изотермической амплификации в присутствии ДНК-полимеразы Bst exo- // Биоорг. химия. 2020. Т. 46. № 1. С. 56-64. <https://doi.org/10.31857/S0132342320010091>
5. Ханова Л.И., Гарафутдинов Р.Р., Сахабутдинова А.Р., Чемерис А.В. Влияние нуклеотидного состава ДНК-матриц на протекание неспецифического (*ab initio*) синтеза ДНК // Biomics. 2022. Т.14(4). С. 359-367. <https://doi.org/10.31301/2221-6197.bmcs.2022-38>
6. Чемерис А.В., Аминев Ф.Г., Гарафутдинов Р.Р., Анисимов В.А., Сагитов А.М., Хуснутдинова Э.К., Сахабутдинова А.Р., Чемерис Д.А., Михайленко К.И. ДНК-криминалистика. М.: Наука, 2022. 466 с.
7. Чемерис А.В., Магданов Э.Г., Гарафутдинов Р.Р., Вахитов В.А. Как исключить появление ложно-положительных результатов при проведении полимеразной цепной реакции? // Вестн. биотехнол. физ.-хим. биол. 2012. Т. 8. № 3. С. 34-45.
8. Чемерис А.В., Чемерис Д.А., Магданов Э.Г., Гарафутдинов Р.Р., Нагаев Н.Р., Вахитов В.А. Причины ложно-негативной ПЦР и недопущение некоторых из них // Биомика. 2012. Т. 4. № 1. С. 31-47.
9. Чемерис Д.А., Магданов Э.Г., Машков О.И., Гарафутдинов Р.Р., Чемерис А.В. ПЦР с отложенным (горячим или задержанным) стартом // Биомика. 2011. Т. 2. № 1. С. 1-8.
10. Broeders S.R., De Keersmaecker S.C., Roosens N.H. How to deal with the upcoming challenges in GMO detection in food and feed // J. Biomed. Biotechnol. 2012. 402418. <https://doi.org/10.1155/2012/402418>
11. Burtis C.A., Ashwood E.R., Bruns D.E. 2013. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. 5th ed. St. Louis: Saunders Elsevier.
12. Compton J. Nucleic acid sequence-based amplification // Nature. 1991. V. 350(6313). P. 91-92. <https://doi.org/10.1038/350091a0>
13. Fire A., Xu S.Q. Rolling replication of short DNA circles // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1995. V. 92(10). P. 4641-4645. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.10.4641>
14. Friesner R.A., R.B. Murphy, M.P. Repasky, L.L. Frye, J.R. Greenwood, T.A. Halgren, P.C. Sanschagrin, D.T. Mainz, Extra Precision Glide: Docking and Scoring Incorporating a Model of Hydrophobic Enclosure for Protein-Ligand Complexes // J. Med. Chem. 2006. V. 49. P. 6177-6196. <https://doi.org/10.1021/jm051256o>
15. Garafutdinov R.R., Gilvanov A.R., Sakhabutdinova A.R. The influence of reaction conditions on DNA multimerization during isothermal amplification with Bst DNA polymerase // Appl. Biochem. Biotechnol. 2020. V. 190. P. 758-771. <https://doi.org/10.1007/s12010-019-03127-6>
16. Garafutdinov R.R., Sakhabutdinova A.R., Kupryushkin M.S., Pyshnyi D.V. Prevention of DNA multimerization during isothermal amplification with Bst exo⁻ DNA polymerase // Biochimie. 2020. V. 168. P. 259-267. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.11.013>
17. Garafutdinov R.R., Galimova A.A., Sakhabutdinova A.R. Polymerase Chain Reaction With Nearby Primers // Anal. Biochem. 2017. V. 518. P. 126-133. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.11.017>
18. Garafutdinov R.R., Kupova O.Yu., Gilvanov A.R., Sakhabutdinova A.R. Data on molecular docking simulations of quaternary complexes 'Bst exo-polymerase-DNA-dCTP-metal cations' // Data-in-Brief. 2020. V. 33, 106549. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2020.106549>
19. Garafutdinov R.R., Gilvanov A.R., Kupova O.Y., Sakhabutdinova A.R. Effect of metal ions on isothermal amplification with Bst exo⁻ DNA polymerase // Int. J. Biol. Macromol. 2020. V. 161. P. 1447-1455. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.028>

20. Myers T.W., Gerald D.H. Reverse transcription and DNA amplification by a *Thermus thermophilus* DNA polymerase // *Biochemistry*. 1991. V. 30. P. 7661-7666. <https://doi.org/10.1021/bi00245a001>
21. Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA // *Nucleic Acids Res.* 2000. V. 28(12). E63. <https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>.
22. Ralec C., Henry E., Lemor M., Killelea T., Henneke G. Calcium-driven DNA synthesis by a high-fidelity DNA polymerase // *Nucleic Acids Res.* 2017. V. 45. P. 12425-12440. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx927>
23. Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia // *Science*. 1985. V. 230. P. 1350-1354. <https://doi.org/10.1126/science.2999980>
24. Sakhabutdinova A.R., Kamalov M.I., Salakhieva D.V., Mavzyutov A.R., Garafutdinov R.R. Inhibition of nonspecific polymerase activity using Poly(Aspartic) acid as a model anionic polyelectrolyte // *Anal. Biochem.* 2021. V. 628. 114267. <https://doi.org/doi:10.1016/j.ab.2021.114267>
25. Sastry G.M., Adzhigirey M., Day T., Annabhimoju R., Sherman W. Protein and ligand preparation: Parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments // *J. Comput. Aid. Mol. Des.* 2013. V. 27. P. 221-234. <https://doi.org/10.1007/s10822-013-9644-8>
26. Steitz T.A. A mechanism for all polymerases // *Nature*. 1998. V. 391. P. 231-232. <https://doi.org/10.1038/34542>.
27. Tsai M.-D. Catalytic mechanism of DNA polymerases - Two metal ions or three? // *Protein Sci.* 2019. V. 28. P. 288-291. <https://doi.org/10.1002/pro.3542>
28. Vashishtha A.K., Wang J., Konigsberg W.H. Different Divalent Cations Alter the Kinetics and Fidelity of DNA Polymerases // *J. Biol. Chem.* 2016. V. 291. P. 20869-20875. <https://doi.org/10.1074/jbc.R116.742494>
29. Vashishtha A.K., Konigsberg W.H. Effect of different divalent cations on the kinetics and fidelity of *Bacillus stearothermophilus* DNA polymerase // *Biochemistry*. 2018. V. 55. P. 2661-2670. <https://doi.org/10.3934/biophy.2018.2.125>
30. Walter N.G., Strunk G. Strand displacement amplification as an in vitro model for rolling-circle replication: deletion formation and evolution during serial transfer // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994. V. 91(17). P. 7937-7941. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.17.7937>
31. Yang W., Weng P.J., Gao Y. A new paradigm of DNA synthesis: three-metal-ion catalysis // *Cell Biosci.* 2016. V. 6. P. 51. <https://doi.org/10.1186/s13578-016-0118-2>
32. Zyrina N.V., Antipova V.N., Zheleznaya L.A. Ab initio synthesis by DNA polymerases // *FEMS Microbiol. Lett.* 2014. V. 351. P. 1-6. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12326>

References

1. Bikbulatova S.M., Chemeris D.A., Nikonorov Yu.M., Mashkov O.I., Garafutdinov R.R., Chemeris A.V., Vakhitov V.A. Methods for detection of real-time polymerase chain reaction results. *Vestn. Bashkir State University*. 2012. V. 17. No. 1. S. 59-67. (In Russian)
2. Broeders S.R., De Keersmaecker S.C., Roosens N.H. How to deal with the upcoming challenges in GMO detection in food and feed. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012. 402418. <https://doi.org/10.1155/2012/402418>
3. Burtis C.A., Ashwood E.R., Bruns D.E. 2013. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. 5th ed. St. Louis: Saunders Elsevier.
4. Chemeris A.V., Aminev F.G., Garafutdinov R.R., Anisimov V.A., Sagitov A.M., Khusnutdinova E.K., Sakhabutdinova A.R., Chemeris D.A., Mikhailenko K.I. DNA forensics. M.: Nauka, 2022. 466 p. (In Russian)
5. Chemeris A.V., Chemeris D.A., Magdanov E.G., Garafutdinov R.R., Nagaev N.R., Vakhitov V.A. Causes of false-negative PCR and prevention of some of them. *Biomics*. 2012. V. 4. No. 1. S. 31-47. (In Russian)
6. Chemeris A.V., Magdanov E.G., Garafutdinov R.R., Vakhitov V.A. How to exclude the appearance of false-positive results during the polymerase chain reaction? *Vestn. biotechnol. fiz.-chem. biol.* 2012. V. 8. No. 3. S. 34-45. (In Russian)
7. Chemeris D.A., Magdanov E.G., Mashkov O.I., Garafutdinov R.R., Chemeris A.V. Delayed (hot-start) PCR. *Biomics*. 2011. V. 2. No. 1. S. 1-8. (In Russian)
8. Compton J. Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature*. 1991. V. 350(6313). P. 91-92. <https://doi.org/10.1038/350091a0>
9. Fire A., Xu S.Q. Rolling replication of short DNA circles. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 1995. V. 92(10). P. 4641-4645. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.10.4641>
10. Friesner R.A., R.B. Murphy, M.P. Repasky, L.L. Frye, J.R. Greenwood, T.A. Halgren, P.C. Sanschagrin, D.T. Mainz, Extra Precision Glide:

- Docking and Scoring Incorporating a Model of Hydrophobic Enclosure for Protein-Ligand Complexes. *J. Med. Chem.* 2006. V. 49. P. 6177-6196. <https://doi.org/10.1021/jm051256o>
11. Garafutdinov R.R., Galimova A.A., Sakhabutdinova A.R. Polymerase Chain Reaction With Nearby Primers. *Anal. Biochem.* 2017. V. 518. P. 126-133. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.11.017>
 12. Garafutdinov R.R., Galimova A.A., Sakhabutdinova A.R., Vakhitov V.A., Chemeris A.V. PCR amplification of DNA with abutting primers. *Mol. Biol.* 2015. V. 49. No. 4. P. 628. <https://doi.org/10.7868/S0026898415040059>
 13. Garafutdinov R.R., Gilvanov A.R., Kupova O.Y., Sakhabutdinova A.R. Effect of metal ions on isothermal amplification with Bst exo- DNA polymerase. *Int. J. Biol. Macromol.* 2020. V. 161. P. 1447-1455. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.028>
 14. Garafutdinov R.R., Gilvanov A.R., Sakhabutdinova A.R. The influence of reaction conditions on DNA multimerization during isothermal amplification with Bst DNA polymerase. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2020. V. 190. P. 758-771. <https://doi.org/10.1007/s12010-019-03127-6>
 15. Garafutdinov R.R., Kupova O.Yu., Gilvanov A.R., Sakhabutdinova A.R. Data on molecular docking simulations of quaternary complexes 'Bst exo-polymerase-DNA-dCTP-metal cations'. *Data-in-Brief.* 2020. V. 33, 106549. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2020.106549>
 16. Garafutdinov R.R., Sakhabutdinova A.R., Gilvanov A.R., Chemeris A.V. Rolling Circle Amplification as a Universal Method for the Analysis of a Wide Range of Biological Targets. *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2021. V. 47(6). P. 1172-1189. <https://doi.org/10.1134/S1068162021060078>
 17. Garafutdinov R.R., Sakhabutdinova A.R., Kupryushkin M.S., Pyshnyi D.V. Prevention of DNA multimerization during isothermal amplification with Bst exo- DNA polymerase. *Biochimie.* 2020. V. 168. P. 259-267. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.11.013>
 18. Khanova L.I., Garafutdinov R.R., Sakhabutdinova A.R., Chemeris A.V. The influence of DNA templates composition on nonspecific (*ab initio*) DNA synthesis. *Biomics.* 2022. V.14(1). P. 359-367. <https://doi.org/10.31301/2221-6197.bmcs.2022-38> (In Russian)
 19. Myers T.W., Gerald D.H. Reverse transcription and DNA amplification by a *Thermus thermophilus* DNA polymerase. *Biochemistry.* 1991. V. 30. P. 7661-7666. <https://doi.org/10.1021/bi00245a001>
 20. Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000. V. 28(12). E63. <https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>
 21. Ralec C., Henry E., Lemor M., Killelea T., Henneke G. Calcium-driven DNA synthesis by a high-fidelity DNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* 2017. V. 45. P. 12425-12440. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx927>
 22. Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 1985. V. 230. P. 1350-1354. <https://doi.org/10.1126/science.2999980>
 23. Sakhabutdinova A.R., Kamalov M.I., Salakhieva D.V., Mavzyutov A.R., Garafutdinov R.R. Inhibition of nonspecific polymerase activity using Poly(Aspartic) acid as a model anionic polyelectrolyte. *Anal. Biochem.* 2021. V. 628. 114267. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2021.114267>
 24. Sakhabutdinova A.R., Mirsaeva L.R., Oscorbin I.P., Filipenko M.L., Garafutdinov R.R. Elimination of DNA Multimerization Arising from Isothermal Amplification in the Presence of Bst Exo- DNA Polymerase. *Rus. J. Bioorg. Chem.* 2020. V. 46. P. 52-59. <https://doi.org/10.1134/s1068162020010082>
 25. Sastry G.M., Adzhigirey M., Day T., Annabhimoju R., Sherman W. Protein and ligand preparation: Parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. *J. Comput. Aid. Mol. Des.* 2013. V. 27. P. 221-234. <https://doi.org/10.1007/s10822-013-9644-8>
 26. Steitz T.A. A mechanism for all polymerases. *Nature.* 1998. V. 391. P. 231-232. <https://doi.org/10.1038/34542>
 27. Tsai M.-D. Catalytic mechanism of DNA polymerases - Two metal ions or three? *Protein Sci.* 2019. V. 28. P. 288-291. <https://doi.org/10.1002/pro.3542>
 28. Vashishtha A.K., Konigsberg W.H. Effect of different divalent cations on the kinetics and fidelity of *Bacillus stearothermophilus* DNA polymerase. *Biochemistry.* 2018. V. 55. P. 2661-2670. <https://doi.org/10.3934/biophy.2018.2.125>
 29. Vashishtha A.K., Wang J., Konigsberg W.H. Different Divalent Cations Alter the Kinetics and Fidelity of DNA Polymerases. *J. Biol. Chem.* 2016. V. 291. P. 20869-20875. <https://doi.org/10.1074/jbc.R116.742494>
 30. Walter N.G., Strunk G. Strand displacement amplification as an in vitro model for rolling-circle replication: deletion formation and evolution during serial transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994. V.

- 91(17). P. 7937-7941. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.17.7937>
31. Yang W., Weng P.J., Gao Y. A new paradigm of DNA synthesis: three-metal-ion catalysis. *Cell Biosci.* 2016. V. 6. P. 51. <https://doi.org/10.1186/s13578-016-0118-2>
32. Zyrina N.V., Antipova V.N., Zheleznaya L.A. Ab initio synthesis by DNA polymerases. *FEMS Microbiol. Lett.* 2014. V. 351. P. 1-6. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12326>