



УДК 577.213.32

АМПЛИФИКАЦИЯ *Tth*-ДНК-ПОЛИМЕРАЗОЙ ФРАГМЕНТОВ ДНК С ПРАЙМЕРАМИ, СОДЕРЖАЩИМИ НЕКОМПЛЕМЕНТАРНЫЕ МАТРИЦЕ НУКЛЕОТИДЫ В 3'-КОНЦЕВОЙ ОБЛАСТИ

© 1997 г. К. Б. Игнатов[#], В. М. Крамаров, О. Л. Узнадзе, А. И. МирошниковИнститут биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 16.09.96 г. Принята к печати 30.04.97 г.

Исследована способность трех термостабильных ферментов, *Tth*-, *Taq*- и *Klentaq*-ДНК-полимераз, осуществлять амплификацию ДНК с праймерами, содержащими некомплементарные нуклеотиды на 3'-конце. Показано, что *Tth*-ДНК-полимераза (в отличие от *Taq* и *Klentaq*) с равной эффективностью осуществляет синтез ДНК с полностью комплементарными праймерами и праймерами, содержащими некомплементарные нуклеотиды в области 3'-конца.

Продемонстрировано, что в некоторых случаях использование *Tth*-ДНК-полимеразы в полимеразной цепной реакции приводит к синтезу большего числа дополнительных (неспецифических) фрагментов ДНК по сравнению с *Taq*-ДНК-полимеразой. Вероятно, это явление обусловлено способностью *Tth*-ДНК-полимеразы элонгировать цепь ДНК при наличии некомплементарных матрице нуклеотидов в 3'-концевой области праймера.

Показана эффективность использования *Tth*-ДНК-полимеразы и смеси *Klentaq/Tth* (в соотношении 100 : 1) при амплификации ДНК с вырожденными праймерами и праймерами со сниженной гомологией.

Ключевые слова: полимеразная цепная реакция (ПЦР), *Tth*-ДНК-полимераза, специфичность амплификации, праймеры.

В последние годы широкое распространение получили методы амплификации ДНК с использованием вырожденных и гомологичных праймеров. Данные методы используются для поиска и клонирования генов, кодирующих белки с известной аминокислотной последовательностью [1–3], гомологичных генов [4–7], для анализа и идентификации геномов [8–11]. Одна из основных проблем, возникающих при использовании вырожденных праймеров и праймеров, содержащих некомплементарные матрице нуклеотиды, – это низкая эффективность амплификации ДНК. Особенно драматичным для амплификации оказывается наличие некомплементарного или вырожденного нуклеотида на 3'-конце праймера [1, 11].

Мы сравнили способность трех наиболее широко используемых термостабильных ДНК-полимераз: *Klentaq* [12], *Taq* [13] и *Tth* [14, 15] – элонгировать цепь ДНК при наличии в 3'-концевой области праймера некомплементарного нуклеотида. Для этого мы провели амплификацию фрагмента ДНК фага λ размером 500 п.о., используя *Taq*-, *Tth*- и *Klentaq*-ДНК-полимеразы и

пары праймеров P γ 1/P γ 6; P γ 2/P γ 6; P γ 3/P γ 6; P γ 4/P γ 6; P γ 5/P γ 6 (табл. 1). Праймеры P γ 1 и P γ 6 полностью комплементарны ДНК фага λ , праймеры P γ 2, 3 и 4 идентичны P γ 1, за исключением 3'-концевого нуклеотида, а в праймере P γ 5 некомплементарный нуклеотид занимает предпоследнее положение с 3'-конца (табл. 1). *Tth*-ДНК-полимераза оказалась нечувствительной к наличию 3'-некомплемтарного нуклеотида (рис. 1, табл. 2). При замене праймера P γ 1 на праймеры P γ 2, 3, 4 или 5 мы не обнаружили снижения эффективности амплификации ДНК (рис. 1, табл. 2). *Taq*- и в еще большей степени *Klentaq*-ДНК-полимеразы весьма чувствительны к наличию некомплементарного нуклеотида в 3'-концевой области праймера, что совпадает с опубликованными данными [1, 11]. Оценивая эффективность амплификации по включению радиоактивно меченного нуклеотида в синтезируемый продукт, мы обнаружили, что при наличии некомплементарного нуклеотида на 3'-конце праймера эффективность ПЦР снизилась в случае использования *Taq*-ДНК-полимеразы примерно в 5 раз, а в случае *Klentaq* – более чем в 10 раз (табл. 2).

Чтобы подтвердить включение некомплементарного нуклеотида в продукт амплификации и отсутствие в препарате *Tth*-ДНК-полимеразы

[#]Автор для переписки

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности праймеров и мест их отжига на матрицах в процессе ПЦР

Матрица	Праймер	Структура* (5' → 3'), а – праймер, б – матрица (3' → 5')					
ДНК фага λ	Prλ 1	а	GATGA	GTTCG	TGTCC	GTACA	ACTGG
		б	-СТАСТ	CAAGC	ACAGG	CATGA	AGACC-
	Prλ 2	а	GATGA	GTTCG	TGTCC	GTACA	ACTGC
		б	-СТАСТ	CAAGC	ACAGG	CATGA	AGACC-
	Prλ 3	а	GATGA	GTTCG	TGTCC	GTACA	ACTGA
		б	-СТАСТ	CAAGC	ACAGG	CATGA	AGACC-
	Prλ 4	а	GATGA	GTTCG	TGTCC	GTACA	ACTGT
		б	-СТАСТ	CAAGC	ACAGG	CATGA	AGACC-
	Prλ 5	а	GATGA	GTTCG	TGTCC	GTACA	ACTCG
		б	-СТАСТ	CAAGC	ACAGG	CATGA	AGACC-
	Prλ 6	а	GGTTA	TCGAA	ATCAG	CCACA	GCGCC
		б	-ССААТ	AGCTT	TAGTC	GGTGT	CGCGG-
Геномная ДНК <i>T. aquaticus</i> YТ-1	TN	а	GATCT	GAAGC	TCTCC	TGGGA	C
		б	-СТАГА	CTTCG	AGAGG	ACCCT	G-
	TC	а	TATCA	CTCCT	TGGCG	GAGAG	CCA
		б	-АТАГТ	GAGGA	ACCGC	CTCTC	GGT-
Геномная ДНК <i>T. thermophilus</i> HB8	TN	а	GATCT	GAAGC	TCTCC	TGGGA	C
		б	-CTGGA	GTCCG	AGAGG	AACCT	C-
	TC	а	TATCA	CTCCT	TGGCG	GAGAG	CCA
		б	-GGGAT	TGGGA	ACCGC	CTTTC	GGT-
Геномная ДНК <i>X. laevis</i>	PX1	а	AGGTC	CAAGG	CTCTA	TCA	
	PX2	а	AGAGG	AGCTG	GCCAG	CA	

* Подчеркнуты некомплементарные матрице нуклеотиды.

3' → 5'-экзонуклеазной активности, мы провели следующий эксперимент. На первом этапе с помощью *Tth*-ДНК-полимеразы и пары праймеров Prλ2/Prλ6 (Prλ2 содержит на 3'-конце некомплементарный нуклеотид) был получен фрагмент ДНК фага λ размером 500 п.о. На втором этапе этот фрагмент был использован в качестве матрицы при реамплификации в ПЦР, осуществленной *Klentaq*-ДНК-полимеразой с парами праймеров Prλ2/Prλ6 и Prλ1/Prλ6 (праймер Prλ1 полно-

стью комплементарен ДНК фага λ). Как видно из рис. 2, реамплификация прошла эффективно только с парой праймеров Prλ2/Prλ6. Это свидетельствует о включении *Tth*-ДНК-полимеразой 3'-некомплементарного нуклеотида праймера Prλ2 в синтезируемый фрагмент ДНК на первом этапе эксперимента.

В некоторых случаях при амплификации ДНК с помощью *Tth*-ДНК-полимеразы наблюдается появление дополнительных неспецифических

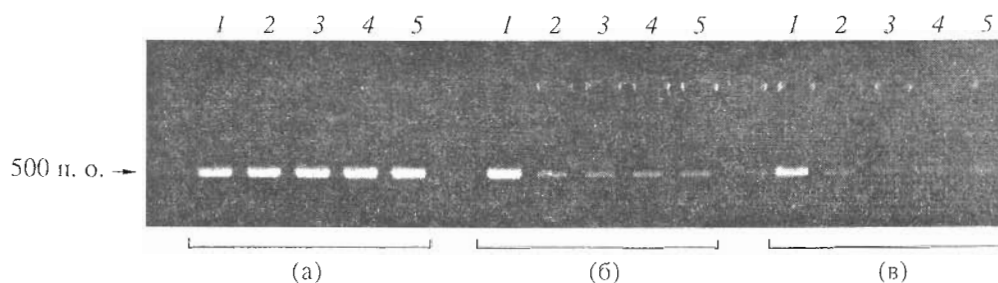


Рис. 1. Электрофорез в 1.2% агарозном геле продуктов амплификации участка ДНК фага λ (500 п.о.) с праймерами, содержащими и не содержащими некомплементарные нуклеотиды (табл. 1). Амплификацию проводили с *Tth*- (а), *Taq*- (б) и *Klentaq*- (в) ДНК-полимеразы и парами праймеров Prλ1/Prλ6 (1), Prλ2/Prλ6 (2), Prλ3/Prλ6 (3), Prλ4/Prλ6 (4), Prλ5/Prλ6 (5).

фрагментов ДНК, что можно объяснить обнаруженным нами свойством *Tth*-ДНК-полимеразы. Примером тому служат результаты ПЦР (рис. 3), полученные на геномной ДНК *Xenopus laevis* с праймерами РХ1 и РХ2 (табл. 1), синтезированными по структуре гена *xanf-1* *X. laevis* [16]. Амплификацию проводили с *Taq*- и *Tth*-ДНК-полимеразой. При проведении амплификации с данными праймерами *Tth*-ДНК-полимераза (в отличие от *Taq*), вероятно, элонгирует их, даже если в случае неспецифического отжига они содержат некомплементарные нуклеотиды в 3'-концевой области. Это приводит к синтезу неспецифических фрагментов ДНК, отсутствующих в продукте ПЦР, полученном с *Taq*-ДНК-полимеразой (рис. 3).

Очевидно, что данная способность *Tth*-ДНК-полимеразы ограничивает ее использование, когда требуется высокая специфичность ПЦР (детекция генетического материала, ПЦР-диагностика и др.), но позволяет использовать этот фермент для эффективной амплификации ДНК с вырожденными праймерами.

Способность *Tth*-ДНК-полимеразы "не замечать" некомплементарные нуклеотиды может быть использована для эффективной амплификации ДНК в тех случаях, когда возможно наличие неспаренных оснований в дуплексе матрица-праймер, например при поиске гомологичных генов методом ПЦР или при амплификации с вырожденными праймерами. Мы использовали *Taq*- и *Tth*-ДНК-полимеразы для амплификации части гена (1790 п.о.), кодирующего *Tth*-ДНК-полимеразу [15], с праймерами TN и TC. Эти праймеры полностью соответствуют структуре гомологичного ему гена *Taq*-ДНК-полимеразы [13] и лишь на 76.1 (TN) и 69.6% (TC) – структуре гена *Tth*-ДНК-полимеразы. Кроме того, в этом случае праймер TN содержит на 3'-конце неспаренный нуклеотид (табл. 1). В качестве матрицы использовали геномную ДНК *Thermus aquaticus* YТ1 и *T. thermophilus* HB8. Как следует из результатов эксперимента, представленных на рис. 4, *Taq*- и *Tth*-ДНК-полимеразы эффективно амплифицируют фрагмент ДНК *T. aquaticus*, однако осуществить амплификацию аналогичного фрагмента ДНК *T. thermophilus* способна только *Tth*-ДНК-полимераза.

Интересное практическое применение может найти также *Tth*-ДНК-полимераза в комбинации с *Klentaq*-ДНК-полимеразой.

Klentaq-ДНК-полимераза получила распространение благодаря своей способности синтезировать ДНК с более низкой частотой внесения мутаций по сравнению с *Taq*-ДНК-полимеразой [12, 17]. Мы предположили, что добавление небольшого количества *Tth*-ДНК-полимеразы в препарат *Klentaq*-ДНК-полимеразы сделает ее способной амплифицировать ДНК с праймерами, содержащими некомплементарные нуклеотиды в

Таблица 2. Включение радиоактивной метки во фрагмент ДНК фага λ (500 п. о.), синтезированный в процессе ПЦР с праймерами, содержащими и не содержащими некомплементарные нуклеотиды

ДНК-полимераза	Праймеры	Радиоактивность, 10 ⁵ имп/мин	Ошибка Стьюдента* (P = 0.05), 10 ³ имп/мин
<i>Tth</i>	Prλ 1/Prλ 6	3.12	7.4
	Prλ 2/Prλ 6	2.92	1.5
	Prλ 3/Prλ 6	2.78	2.5
	Prλ 4/Prλ 6	2.88	4.2
	Prλ 5/Prλ 6	2.93	1.2
<i>Taq</i>	Prλ 1/Prλ 6	2.42	3.1
	Prλ 2/Prλ 6	0.43	1.2
	Prλ 3/Prλ 6	0.47	1.5
	Prλ 4/Prλ 6	0.45	1.2
	Prλ 5/Prλ 6	0.50	2.3
<i>Klentaq</i>	Prλ 1/Prλ 6	2.30	7.3
	Prλ 2/Prλ 6	0.15	1.8
	Prλ 3/Prλ 6	0.11	1.0
	Prλ 4/Prλ 6	0.17	1.5
	Prλ 5/Prλ 6	0.20	2.1
Фоновое значение (без добавления полимеразы)		0.013	0.3

* Расчет ошибки проведен с помощью статистической программы Sigma Plot фирмы Jandel Scientific.

3'-концевой области. Наша идея заключалась в том, что *Tth*-ДНК-полимераза на начальном этапе ПЦР осуществляет синтез небольшого количества фрагмента ДНК, который *Klentaq*-ДНК-полимераза в дальнейшем сможет использовать в

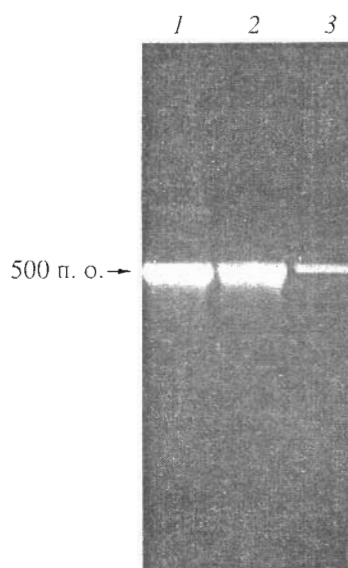


Рис. 2. Электрофорез в 1.2% агарозном геле продуктов реамплификации *Klentaq*-ДНК-полимеразой фрагмента ДНК фага λ (500 п.о.). 1 – фрагмент, синтезированный *Tth*-ДНК-полимеразой с праймерами Prλ2 и Prλ6, реамплификация этого фрагмента *Klentaq*-ДНК-полимеразой с парами праймеров Prλ2/Prλ6 (2) и Prλ 1/Prλ6 (3).

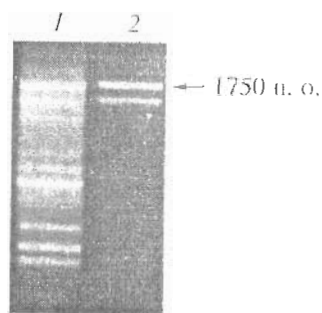


Рис. 3. Электрофорез в 1.2% агарозном геле продуктов амплификации геномной ДНК *X. laevis* с праймерами РХ1 и РХ2. Реакцию проводили с *Tth*-ДНК-полимеразой (1) и *Taq*-ДНК-полимеразой (2).

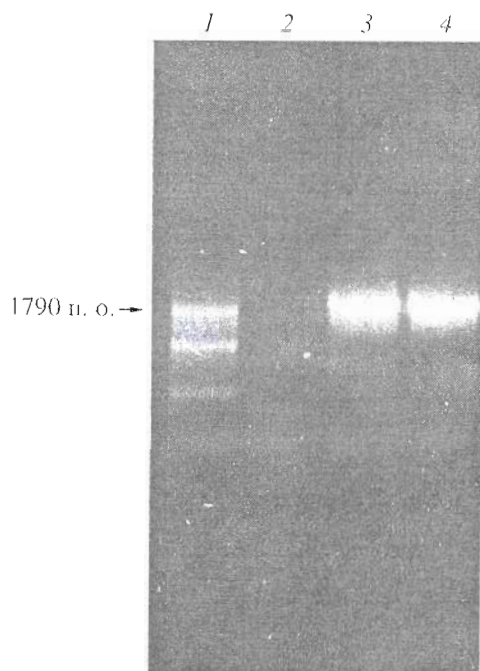


Рис. 4. Электрофорез в 1% агарозном геле образцов, полученных при амплификации с праймерами TN и TC фрагментов геномной ДНК *T. thermophilus* HB8 (1, 2) и *T. aquaticus* YT1 (3, 4). Реакцию проводили с ДНК-полимеразой *Tth* (1, 3) и *Taq* (2, 4).

качестве матрицы, причем в этом случае праймеры уже будут комплементарны матрице, что обеспечит эффективность синтеза ДНК *Klentaq*-полимеразой.

Чтобы проверить нашу идею и подобрать оптимальное соотношение *Klentaq*- и *Tth*-полимераз, мы смешали ферменты в соотношении *Klentaq/Tth* (по активности) 50/1, 100/1, 150/1, 200/1, 250/1 и провели амплификацию фрагмента ДНК фага λ (500 п.о.) с праймерами P γ 2 и P γ 6 (праймер P γ 2 содержит некомплементарный нуклеотид — табл. 1). Результаты этого эксперимента (рис. 5а) подтвердили наши предположения. Добавление к *Klentaq*-полимеразе незначительного

количества *Tth*-ДНК-полимеразы (0.007 ед. акт. *Tth* на 1 ед. акт. *Klentaq*) позволило многократно увеличить эффективность ПЦР. Аналогичные результаты мы получили, проведя ПЦР с праймерами TN и TC, используя в качестве матрицы геномную ДНК *T. thermophilus* HB8. Данные анализы продуктов ПЦР в 1.5% агарозном геле представлены на рис. 5б. Использование смеси *Klentaq/Tth* в соотношении 100/1 или 150/1 (по активности) дало результат, аналогичный полученному при использовании *Tth*-ДНК-полимеразы. Однако мы предполагаем, что в случае смеси ферментов *Klentaq/Tth* число внесенных в ДНК мутаций будет определяться свойствами *Klentaq*-ДНК-полимеразы (находящейся в избытке) и будет ниже, чем при использовании *Taq*- или *Tth*-ДНК-полимераз.

Как показано в работах [12, 17], присоединение к 3'-концу ДНК некомплементарного нуклеотида может приводить к терминации синтеза ДНК в случае ДНК-полимераз, не обладающих 3' → 5'-экзонуклеазной активностью (*Taq*- и *Klentaq*-полимеразы), и является фактором, способным ограничивать процессивность данных ферментов. Добавление незначительного количества полимеразы с 3' → 5'-экзонуклеазной активностью (*Pfu*, *Vent*) приводит к заметному увеличению процессивности *Klentaq*- и *Taq*-ДНК-полимераз. В работе [18] показано, что добавление *Vent*-ДНК-полимеразы к *Tth*-ДНК-полимеразе не оказывает существенного влияния на способность фермента амплифицировать длинные фрагменты ДНК. Обнаруженное нами свойство *Tth*-ДНК-полимеразы дает возможность объяснить ее способность амплифицировать более длинные последовательности ДНК [19] и отсутствие влияния *Vent*-полимеразы на синтез длинных фрагментов в ПЦР при добавлении последней в реакционную смесь.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе были использованы *Taq*-ДНК-полимераза (5 ед. акт./мкл) и *Tth*-ДНК-полимераза (2.5 ед. акт./мкл) фирмы Perkin-Elmer; *Klentaq*-ДНК-полимераза (25 ед. акт./мкл) получена в лаборатории биотехнологии Института биоорганической химии РАН (за 1 ед. акт. ДНК-полимеразы принимали количество фермента, способное включать 10 нмоль дезоксирибонуклеозидтрифосфатов в кислотонерастворимую фракцию за 30 мин при 73°C); [α -³²P]dATP с уд. акт. 2000 Ки/ммоль (произведено в ИБХ РАН).

ПЦР осуществляли на приборе DNA Thermal Cycler 480 (Perkin-Elmer-Cetus). Реакционная смесь содержала 67 мМ трис-НСI (рН 8.8); 16.6 мМ (NH₄)₂SO₄; 0.01% Tween-20; dATP, dGTP, dCTP, dTTP в концентрации 0.2 мМ каждый; по 15–17 нмоль каждого праймера; 1.5 мМ MgCl₂

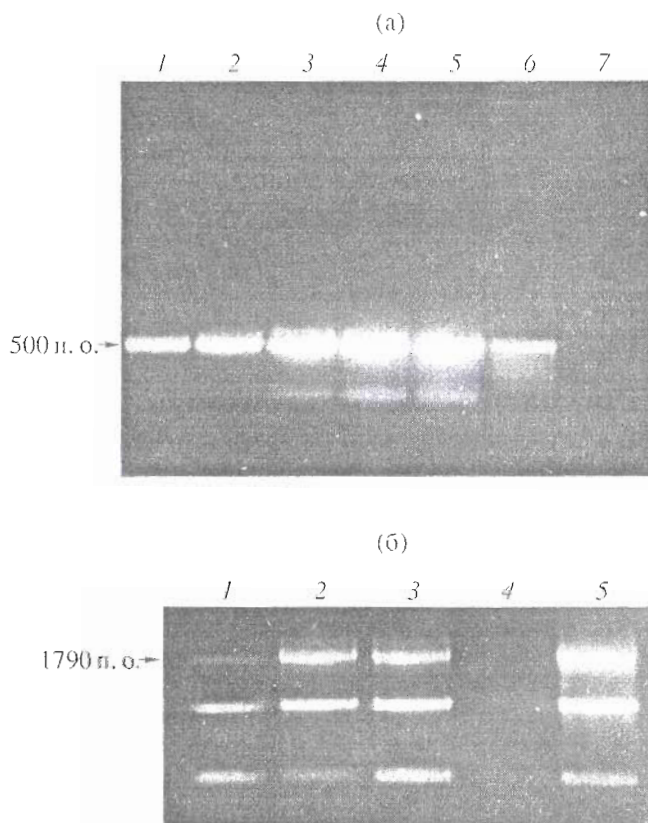


Рис. 5. Электрофорез в 1.5% агарозном геле продуктов ПЦР, полученных с помощью *Tth*-, *Klentaq*-ДНК-полимераз и их смесей. (а) – амплификация ДНК фага λ с праймерами Pr λ 2/Pr λ 6: 1–5 – 10 ед. акт. *Klentaq* + 0.04, 0.05, 0.067, 0.1, 0.2 ед. акт. *Tth* соответственно; 6 – 0.5 ед. акт. *Tth*; 7 – 10 ед. акт. *Klentaq*. (б) – амплификация геномной ДНК *T. thermophilus* NB8 с праймерами TN/ТС: 1–3 – 10 ед. акт. *Klentaq* и 0.05, 0.067, 0.1 ед. акт. *Tth* соответственно; 4 – 10 ед. акт. *Klentaq*; 5 – 2.5 ед. акт. *Tth*.

(для *Taq* и *Tth*) или 3.3 мМ (для *Klentaq*). Реакцию проводили в объеме 50 мкл с 2.5 ед. акт. *Taq*-, 2.5 ед. акт. *Tth*- или 10 ед. акт. *Klentaq*-ДНК-полимеразы.

Амплификацию фрагмента ДНК фага λ (500 п.о.) проводили с праймерами Pr λ 1/Pr λ 6; Pr λ 2/Pr λ 6; Pr λ 3/Pr λ 6; Pr λ 4/Pr λ 6; Pr λ 5/Pr λ 6 (табл. 1). В качестве матрицы использовали ДНК фага λ . Температурный режим: 94°C – 45 с, 59°C – 30 с, 72°C – 30 с. Число циклов 25.

Для оценки количества синтезированной ДНК в реакционную смесь добавляли [α - 32 P]dATP (до концентрации 0.04 мкКи/мкл) и определяли количество радиоактивности, включенной в кислотонерастворимую фракцию. Для этого 20 мкл реакционной смеси после проведения ПЦР наносили на фильтр GF/B (Whatman) и промывали 10% раствором трихлоруксусной кислоты, фильтры высушивали. Количество радиоактивности подсчитывали

на сцинтилляционном счетчике Beckman LS 9800 со сцинтиллятором Ready-Solv HP (Beckman).

Реамплификацию проводили в тех же условиях. В реакционную смесь (50 мкл) вносили 0.2 нг соответствующего продукта амплификации и 10 ед. акт. *Klentaq*-ДНК-полимеразы.

Амплификацию фрагментов генов ДНК-полимераз из *T. aquaticus* и *T. thermophilus* (1790 п.о.) проводили с праймерами TN и ТС (табл. 1). Матрицами служили геномная ДНК *T. aquaticus* УТ-1 и *T. thermophilus* НВ-8 (100 нг в 50 мкл). При амплификации фрагмента ДНК *T. aquaticus* температурный режим был следующим: 94°C – 1 мин, 60°C – 45 с, 72°C – 1 мин, а при амплификации фрагмента ДНК *T. thermophilus* – 94°C – 1 мин, 58°C – 45 с, 72°C – 1 мин. Число циклов 25.

ПЦР с геномной ДНК *X. laevis* и праймерами РХ1 и РХ2 (табл. 1) проводили в следующем режиме: 94°C – 1 мин; 60°C – 45 с; 72°C – 1 мин. Число циклов 30. Реакционная смесь (50 мкл) содержала 150 нг геномной ДНК.

Авторы выражают благодарность А.Г. Зарайскому за предоставление геномной ДНК *X. laevis* и праймеров РХ1, РХ2.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. PCR Protocols / Eds M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky. N.Y.: Acad. Press, Inc., 1990.
2. Reymond I., Sergeant A., Tappaz M. // Biochim. Biophys. Acta. 1996. V. 1307. P. 152–156.
3. Baker R.T., Williamson N.A., Wettenhall R.E.H. // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. P. 13549–13555.
4. Wilks A.F., Kurban R.R., Hovens C.M., Ralph S.J. // Gene. 1989. V. 85. P. 67–74.
5. Skinner T.L., Kerns R.T., Bender P.K. // Gene. 1994. V. 151. P. 247–251.
6. Maier J., Wüster K., Gutlich M., Ziegler I., Werner T., Ninnemann H. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1995. V. 212. P. 705–711.
7. Joshi C.P., Kumar S., Nguyen H.T. // Plant. Mol. Biol. 1996. V. 30. P. 641–646.
8. Robertson N.L., French R., Gray S.M. // J. Gen. Virol. 1991. V. 72. P. 1473–1477.
9. Kaltenboeck B., Kousoulas K.G., Storz J. // J. Clin. Microbiol. 1991. V. 29. P. 1969–1975.
10. Telenius H., Carter N.P., Bebb C.E., Nordenskjold M., Ponder B.A., Tunnacliffe A. // Genomics. 1992. V. 13. P. 718–725.
11. Sakallah S.A., Lanning R.W., Cooper D.L. // PCR Methods Appl. 1995. V. 4. P. 265–268.
12. Barnes W.M. // Gene. 1992. V. 112. P. 29–35.
13. Lawyer F.C., Stoffel S., Saiki R.K., Myambo K., Drummond R., Gelfand D.H. // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. P. 6427–6437.
14. Myers T.W., Gelfand D.H. // Biochemistry. 1991. V. 30. P. 7661–7666.

15. Lawyer F.C., Stoffel S., Gelfand D.H. Recombinant Expression Vectors and Purification Methods for *Thermus thermophilus* DNA Polymerase: U.S. Patent № 9007639 // PCT. 1991. P. 7–13.
16. Zraisky A.G., Lukyanov S.A., Vasiliev O.L., Smirnov Y.V., Belyavsky A.V., Kazanskaya O.V. // Dev. Biol. 1992. V. 152. P. 373–383.
17. Barnes W.M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. V. 91. P. 2216–2220.
18. Cheng S., Fockler C., Barnes W.M., Higuchi R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. V. 91. P. 5695–5699.
19. Ohler L.D., Rose E.A. // PCR Methods Appl. 1992. V. 2. P. 51–59.

***Tth* DNA Polymerase-Mediated Amplification of DNA Fragments Using Primers with Mismatches in the 3'-Region**

K. B. Ignatov, V. M. Kramarov, O. L. Uznadze, and A. I. Miroshnikov

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia

Abstract—The ability of three thermostable enzymes, *Tth*, *Taq*, and *Klentaq* DNA polymerases, to amplify DNA with primers containing mismatches in the 3'-terminal region was studied. It is shown that *Tth* polymerase, in contrast to the *Taq* and *Klentaq* enzymes, synthesizes equally well DNA with primers perfectly complementary to the template and with those containing mismatches next the 3'-end. The use of *Tth* DNA polymerase in the polymerase chain reaction was shown to result, in some cases, in a great number of additional, nonspecific DNA fragments as compared with *Taq* DNA polymerase. This may be due to the ability of *Tth* polymerase for DNA primer extension even if the 3'-terminal region of the primer contains nucleotides non-complementary to the template. *Tth* DNA polymerase and a *Klentaq/Tth* mixture (100 : 1) can be efficiently used in the amplification of DNA with degenerated primers and primers forming nonperfect duplexes with the template.

Key words: polymerase chain reaction (PCR), *Tth* DNA polymerase, amplification specificity, primers.