Supporting Information

The Unnatural Substrate Repertoire of A, B, and X Family DNA polymerases

Gil Tae Hwang and Floyd E. Romesberg

Table of Contents

Table S1. Kf–Mediated Incorporation of Natural and Unnatural Triphosphates dNTPs (d**X**TPs)[a,b]

5'–dTAATACGACTCACTATAGGGAGA
3'–dATTATGCTGAGTGATATCCCTCT(**Y**)GCTAGGTTACGGCAGGATCGC

X	**Y**	k_{cat} (min^{-1})	K_M (μM)	k_{cat}/K_M (M^{-1} min^{-1})
dA	dT	6.0 ± 0.9	0.019 ± 0.001	3.2×10^8
dG	dT	4.4 ± 0.3	77 ± 12	5.7×10^4
d**PICS**	d**PICS**	0.90 ± 0.04	3.7 ± 0.7	2.4×10^5
dA	d**PICS**	0.17± 0.07	92 ± 30	1.8×10^3
dC	d**PICS**	0.22 ± 0.12	123 ± 81	1.8×10^3
dG	d**PICS**	0.12 ± 0.04	69 ± 22	1.7×10^3
dT	d**PICS**	0.89 ± 0.15	76 ± 36	1.2×10^4
d**7AI**	d**7AI**	8.7 ± 0.5	40 ± 5	2.2×10^5
dA	d**7AI**	0.32 ± 0.02	54 ± 10	5.9×10^3
dC	d**7AI**	0.17 ± 0.02	31 ± 11	5.5×10^3
dG	d**7AI**	0.08 ± 0.01	49 ± 13	1.6×10^3
dT	d**7AI**	0.23 ± 0.05	146 ± 40	1.6×10^3
d**3FB**	d**3FB**	25 ± 4	12 ± 2	2.1×10^6
dA	d**3FB**	26± 4	48 ± 10	5.4×10^5
dC	d**3FB**	0.4 ± 0.1	195 ± 35	2.1×10^3
dG	d**3FB**	0.3 ± 0.1	168 ± 80	1.8×10^3
dT	d**3FB**	15 ± 8	158 ± 23	9.5×10^4
d**MMO2**	d**5SICS**	12 ± 1	33 ± 6	3.6×10^5
d**5SICS**	d**5SICS**	1.7 ± 0.5	63 ± 4	2.7×10^4
dA	d**5SICS**	1.2 ± 0.3	54 ± 6	2.2×10^4
dC	d**5SICS**	nd[c]	nd[c]	$<1.0 \times 10^3$
dG	d**5SICS**	4.6 ± 0.6	36 ± 4	1.3×10^5
dT	d**5SICS**	1.7 ± 0.2	130 ± 19	1.3×10^4
d**5SICS**	d**MMO2**	8.5 ± 0.1	0.18 ± 0.01	4.7×10^7
d**MMO2**	d**MMO2**	5.1 ± 0.7	44 ± 4	1.2×10^5
dA	d**MMO2**	3.3 ± 0.3	32 ± 4	1.0×10^5
dC	d**MMO2**	nd[c]	nd[c]	$<1.0 \times 10^3$
dG	d**MMO2**	nd[c]	nd[c]	$<1.0 \times 10^3$
dT	d**MMO2**	nd[c]	nd[c]	$<1.0 \times 10^3$

[a]See experimental section for experimental details. [b]Ref. 1–4. [c]Reaction was too inefficient for k_{cat} and K_M to be determined.

Table S2. Kf–Mediated Extension of d**X**:d**Y** Pairs[a,b]

5'–dTAATACGACTCACTATAGGGAGA(**X**)
3'–dATTATGCTGAGTGATATCCCTCT(**Y**)GCTAGGTTACGGCAGGATCGC

X	**Y**	k_{cat} (min^{-1})	K_M (μM)	k_{cat}/K_M (M^{-1} min^{-1})
dA	dT	1.3 ± 0.4	0.0077 ± 0.0044	1.7×10^8
dG	dT	3.6 ± 0.5	7.5 ± 1.6	4.8×10^5
d**PICS**	d**PICS**	nd[c]	nd[c]	$<1.0 \times 10^3$
dT	d**PICS**	2.5 ± 0.1	12 ± 4	2.0×10^5
d**7AI**	d**7AI**	nd[c]	nd[c]	$<1.0 \times 10^3$
dA	d**7AI**	0.11 ± 0.04	56 ± 9	1.9×10^3
dC	d**7AI**	0.86 ± 0.10	193 ± 8	4.5×10^3
d**3FB**	d**3FB**	28 ± 4	85 ± 24	3.3×10^5
dA	d**3FB**	17 ± 4	268 ± 60	6.3×10^4
dC	d**3FB**	4.2 ± 0.7	310 ± 80	1.4×10^4
dG	d**3FB**	nd[c]	nd[c]	$<1.0 \times 10^3$
dT	d**3FB**	25 ± 4	132 ± 60	1.9×10^5
d**MMO2**	d**5SICS**	6.4 ± 1.1	3.4 ± 0.3	1.9×10^6
d**5SICS**	d**5SICS**	nd[c]	nd[c]	$<1.0 \times 10^3$
dG	d**5SICS**	0.62 ± 0.02	127 ± 8	4.9×10^3
dT	d**5SICS**	2.0 ± 0.1	4.9 ± 0.3	4.0×10^5
d**5SICS**	d**MMO2**	3.8 ± 0.3	5.7 ± 1.2	6.7×10^5
d**MMO2**	d**MMO2**	0.87 ± 0.28	165 ± 47	5.3×10^3
dA	d**MMO2**	8.7 ± 0.9	187 ± 17	4.6×10^4

[a]See experimental section for experimental details. [b]Ref. 1–4. [c]Reaction was too inefficient for k_{cat} and K_M to be determined.

Table S3. T7–Mediated Incorporation of Natural and Unnatural Triphosphates dNTPs (d**X**TPs)[a]

5'–dTAATACGACTCACTATAGGGAGA
3'–dATTATGCTGAGTGATATCCCTCT(**Y**)GCTAGGTTACGGCAGGATCGC

X	**Y**	k_{cat} (min^{-1})	K_M (μM)	k_{cat}/K_M (M^{-1} min^{-1})
dA	dT	0.36 ± 0.06	0.024 ± 0.006	1.5×10^7
dG	dT	1.2 ± 0.1	1196 ± 90	9.8×10^2
d**PICS**	d**PICS**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
dA	d**PICS**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
dC	d**PICS**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
dG	d**PICS**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
dT	d**PICS**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
d**7AI**	d**7AI**	1.7 ± 0.2	754 ± 109	2.2×10^3
dA	d**7AI**	0.38 ± 0.14	310 ± 55	1.2×10^3
dC	d**7AI**	0.14 ± 0.01	128 ± 38	1.1×10^3
dG	d**7AI**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
dT	d**7AI**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
d**3FB**	d**3FB**	1.7 ± 0.1	32 ± 8	5.3×10^4
dA	d**3FB**	29 ± 5	259± 40	1.1×10^5
dC	d**3FB**	0.70 ± 0.15	381 ± 48	1.8×10^3
dG	d**3FB**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
dT	d**3FB**	0.85 ± 0.23	10 ± 3	8.1×10^4
d**MMO2**	d**5SICS**	2.1 ± 0.5	57 ± 4	3.7×10^4
d**5SICS**	d**5SICS**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
dA	d**5SICS**	0.37 ± 0.06	221 ± 26	1.7×10^3
dC	d**5SICS**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
dG	d**5SICS**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
dT	d**5SICS**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
d**5SICS**	d**MMO2**	9.7 ± 1.9	8.7 ± 0.2	1.1×10^6
d**MMO2**	d**MMO2**	3.4 ± 0.6	220 ± 4	1.5×10^4
dA	d**MMO2**	4.2 ± 0.4	73 ± 18	5.8×10^4
dC	d**MMO2**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
dG	d**MMO2**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
dT	d**MMO2**	5.4 ± 0.5	2912 ± 476	1.9×10^3

[a]See experimental section for experimental details. [b]Reaction was too inefficient for k_{cat} and K_M to be determined.

Table S4. T7–Mediated Extension of d**X**:d**Y** Pairs[a]

5'–dTAATACGACTCACTATAGGGAGA(**X**)
3'–dATTATGCTGAGTGATATCCCTCT(**Y**)GCTAGGTTACGGCAGGATCGC

X	**Y**	k_{cat} (min^{-1})	K_M (μM)	k_{cat}/K_M (M^{-1} min^{-1})
dA	dT	4.3 ± 0.6	0.32± 0.04	1.3×10^7
dG	dT	2.1 ± 0.5	119 ± 21	1.8×10^4
d**PICS**	d**PICS**	0.22 ± 0.05	81 ± 25	2.8×10^3
dA	d**PICS**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
d**7AI**	d**7AI**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
dA	d**7AI**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
dC	d**7AI**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
d**3FB**	d**3FB**	3.6 ± 0.3	24 ± 4	1.5×10^5
dA	d**3FB**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
dT	d**3FB**	0.49 ± 0.01	144 ± 6	3.4×10^3
d**MMO2**	d**5SICS**	2.4 ± 0.5	4.4 ± 1.9	5.4×10^5
d**5SICS**	d**5SICS**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
dA	d**5SICS**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
dG	d**5SICS**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
d**5SICS**	d**MMO2**	3.2 ± 0.6	2.9 ± 0.7	1.1×10^6
d**MMO2**	d**MMO2**	2.0 ± 0.3	342 ± 80	5.9×10^3
dA	d**MMO2**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$

[a]See experimental section for experimental details. [b]Reaction was too inefficient for k_{cat} and K_M to be determined.

Table S5. Taq–Mediated Incorporation of Natural and Unnatural Triphosphates dNTPs (d**X**TPs)[a]

5'–dTAATACGACTCACTATAGGGAGA
3'–dATTATGCTGAGTGATATCCCTCT(**Y**)GCTAGGTTACGGCAGGATCGC

X	**Y**	k_{cat} (min^{-1})	K_M (μM)	k_{cat}/K_M (M^{-1} min^{-1})
dA	dT	0.81 ± 0.20	0.020 ± 0.008	4.0×10^7
dG	dT	3.4 ± 0.1	137 ± 28	2.5×10^4
d**PICS**	d**PICS**	3.7 ± 0.2	144 ± 18	2.6×10^4
dA	d**PICS**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
dC	d**PICS**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
dG	d**PICS**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
dT	d**PICS**	0.24 ± 0.04	195 ± 30	1.2×10^3
d**7AI**	d**7AI**	1.8 ± 0.2	155 ± 1	1.2×10^4
dA	d**7AI**	0.67 ± 0.04	162 ± 16	4.1×10^3
dC	d**7AI**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
dG	d**7AI**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
dT	d**7AI**	0.40 ± 0.12	176 ± 17	2.3×10^3
d**3FB**	d**3FB**	3.0 ± 0.4	203 ± 14	1.5×10^4
dA	d**3FB**	5.8 ± 1.3	63 ± 1	9.1×10^4
dC	d**3FB**	0.17 ± 0.01	84 ± 10	2.1×10^3
dG	d**3FB**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
dT	d**3FB**	3.7 ± 0.9	132 ± 8	2.8×10^4
d**MMO2**	d**5SICS**	1.3 ± 0.2	16 ± 1	8.6×10^4
d**5SICS**	d**5SICS**	1.2 ± 0.1	375 ± 62	3.2×10^3
dA	d**5SICS**	0.74 ± 0.11	274 ± 40	2.7×10^3
dC	d**5SICS**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
dG	d**5SICS**	4.0 ± 1.1	110 ± 15	3.7×10^4
dT	d**5SICS**	0.96 ± 0.09	261 ± 48	3.7×10^3
d**5SICS**	d**MMO2**	3.0 ± 0.2	0.88 ± 0.10	3.5×10^6
d**MMO2**	d**MMO2**	1.1 ± 0.1	52 ± 13	2.1×10^4
dA	d**MMO2**	6.4 ± 0.9	59 ± 6	1.1×10^5
dC	d**MMO2**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
dG	d**MMO2**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
dT	d**MMO2**	1.8 ± 0.1	214 ± 28	8.2×10^3

[a]See experimental section for experimental details. [b]Reaction was too inefficient for k_{cat} and K_M to be determined.

Table S6. Taq–Mediated Extension of d**X**:d**Y** Pairs[a]

5'–dTAATACGACTCACTATAGGGAGA(**X**)
3'–dATTATGCTGAGTGATATCCCTCT(**Y**)GCTAGGTTACGGCAGGATCGC

X	**Y**	k_{cat} (min^{-1})	K_M (μM)	k_{cat}/K_M (M^{-1} min^{-1})
dA	dT	1.8 ± 0.1	0.096 ± 0.014	1.9×10^7
dG	dT	1.6 ± 0.4	218 ± 16	7.4×10^3
d**PICS**	d**PICS**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
dT	d**PICS**	0.29 ± 0.04	184 ± 14	1.6×10^3
d**7AI**	d**7AI**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
dA	d**7AI**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
d**3FB**	d**3FB**	2.2 ± 0.6	141 ± 7	1.6×10^4
dA	d**3FB**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
dT	d**3FB**	0.24 ± 0.02	225 ± 59	1.1×10^3
d**MMO2**	d**5SICS**	0.95 ± 0.03	44 ± 3	2.2×10^4
d**5SICS**	d**5SICS**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
dA	d**5SICS**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
dG	d**5SICS**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
dT	d**5SICS**	0.92 ± 0.07	196 ± 35	4.7×10^3
d**5SICS**	d**MMO2**	2.6 ± 0.9	41 ± 6	6.4×10^4
d**MMO2**	d**MMO2**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
dA	d**MMO2**	0.59 ± 0.01	359 ± 29	1.7×10^3
dT	d**MMO2**	0.90 ± 0.01	84 ± 8	1.1×10^4

[a]See experimental section for experimental details. [b]Reaction was too inefficient for k_{cat} and K_M to be determined.

Table S7. Vent—Mediated Incorporation of Natural and Unnatural Triphosphates dNTPs (d**X**TPs)[a]

5'-dTAATACGACTCACTATAGGGAGA
3'-dATTATGCTGAGTGATATCCCTCT(**Y**)GCTAGGTTACGGCAGGATCGC

X	**Y**	k_{cat} (min^{-1})	K_M (μM)	k_{cat}/K_M (M^{-1} min^{-1})
dA	dT	1.3 ± 0.1	0.11 ± 0.01	1.2×10^7
dG	dT	2.2 ± 0.4	129 ± 45	1.7×10^4
d**PICS**	d**PICS**	3.3 ± 0.1	52 ± 18	6.4×10^4
dA	d**PICS**	1.9 ± 0.6	121 ± 16	1.6×10^4
dC	d**PICS**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
dG	d**PICS**	1.5 ± 0.4	269 ± 98	5.5×10^3
dT	d**PICS**	3.5 ± 0.2	427 ± 97	8.3×10^3
d**7AI**	d**7AI**	2.7 ± 0.3	124 ± 17	2.2×10^4
dA	d**7AI**	2.5 ± 0.1	167 ± 10	1.5×10^4
dC	d**7AI**	0.73 ± 0.22	244 ± 36	3.0×10^3
dG	d**7AI**	1.7 ± 0.3	852 ± 90	2.0×10^3
dT	d**7AI**	2.9 ± 0.6	174 ± 43	1.7×10^4
d**3FB**	d**3FB**	0.97 ± 0.03	21 ± 5	4.6×10^4
dA	d**3FB**	4.4 ± 0.5	68 ± 8	6.4×10^4
dC	d**3FB**	0.83 ± 0.17	278 ± 46	3.0×10^3
dG	d**3FB**	1.5 ± 0.2	293 ± 39	5.1×10^3
dT	d**3FB**	1.8 ± 0.6	69 ± 4	2.6×10^4
d**MMO2**	d**5SICS**	2.5 ± 0.4	1.9 ± 0.4	1.3×10^6
d**5SICS**	d**5SICS**	5.7 ± 0.9	11 ± 1	5.0×10^5
dA	d**5SICS**	6.5 ± 0.5	129 ± 26	5.0×10^4
dC	d**5SICS**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
dG	d**5SICS**	5.9 ± 0.5	154 ± 43	3.8×10^4
dT	d**5SICS**	2.6 ± 0.6	37 ± 7	7.0×10^4
d**5SICS**	d**MMO2**	3.1 ± 0.2	0.31 ± 0.03	9.9×10^6
d**MMO2**	d**MMO2**	2.2 ± 0.4	18 ± 4	1.2×10^5
dA	d**MMO2**	2.1 ± 0.2	66 ± 5	3.2×10^4
dC	d**MMO2**	1.2 ± 0.2	27 ± 2	4.4×10^4
dG	d**MMO2**	1.1 ± 0.3	393 ± 84	2.9×10^3
dT	d**MMO2**	1.4 ± 0.4	11 ± 1	1.2×10^5

[a]See experimental section for experimental details. [b]Reaction was too inefficient for k_{cat} and K_M to be determined.

Table S8. Vent–Mediated Extension of d**X**:d**Y** Pairs[a]

5'–dTAATACGACTCACTATAGGGAGA(**X**)
3'–dATTATGCTGAGTGATATCCCTCT(**Y**)GCTAGGTTACGGCAGGATCGC

X	**Y**	k_{cat} (min^{-1})	K_M (μM)	k_{cat}/K_M (M^{-1} min^{-1})
dA	dT	0.68 ± 0.11	0.23 ± 0.03	2.9×10^6
dG	dT	0.40 ± 0.11	27 ± 6	1.5×10^4
d**PICS**	d**PICS**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
dA	d**PICS**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
dG	d**PICS**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
dT	d**PICS**	0.33 ± 0.02	308 ± 12	1.1×10^3
d**7AI**	d**7AI**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
dA	d**7AI**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
dT	d**7AI**	0.30 ± 0.05	288 ± 1	1.0×10^3
d**3FB**	d**3FB**	3.0 ± 0.2	524 ± 17	5.7×10^3
dA	d**3FB**	0.50 ± 0.06	435 ± 88	1.1×10^3
dT	d**3FB**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
d**MMO2**	d**5SICS**	0.95 ± 0.17	153 ± 11	6.2×10^3
d**5SICS**	d**5SICS**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
dA	d**5SICS**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
dG	d**5SICS**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
dT	d**5SICS**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
d**5SICS**	d**MMO2**	1.1 ± 0.1	145 ± 22	7.9×10^3
d**MMO2**	d**MMO2**	0.18 ± 0.02	150 ± 5	1.2×10^3
dT	d**MMO2**	0.14 ± 0.02	36 ± 11	3.8×10^3

[a]See experimental section for experimental details. [b]Reaction was too inefficient for k_{cat} and K_M to be determined.

Table S9. Therminator—Mediated Incorporation of Natural and Unnatural Triphosphates dNTPs (d**X**TPs)[a]

5'-dTAATACGACTCACTATAGGGAGA
3'-dATTATGCTGAGTGATATCCCTCT(**Y**)GCTAGGTTACGGCAGGATCGC

X	**Y**	k_{cat} (min^{-1})	K_M (μM)	k_{cat}/K_M (M^{-1} min^{-1})
dA	dT	0.30 ± 0.02	0.0020 ± 0.0006	1.5×10^8
dG	dT	0.62 ± 0.01	0.33 ± 0.02	1.9×10^6
d**PICS**	d**PICS**	0.43 ± 0.08	0.16 ± 0.03	2.7×10^6
dA	d**PICS**	0.40 ± 0.05	0.38 ± 0.07	1.1×10^6
dC	d**PICS**	0.36 ± 0.09	2.0 ± 0.6	1.8×10^5
dG	d**PICS**	0.64 ± 0.10	2.4 ± 0.1	2.6×10^5
dT	d**PICS**	0.89 ± 0.22	2.1 ± 0.5	4.3×10^5
d**7AI**	d**7AI**	0.38 ± 0.10	0.090 ± 0.018	4.2×10^6
dA	d**7AI**	0.54 ± 0.04	0.59 ± 0.10	9.2×10^5
dC	d**7AI**	0.53 ± 0.05	4.6 ± 1.1	1.2×10^5
dG	d**7AI**	0.62 ± 0.10	5.6 ± 0.3	1.1×10^5
dT	d**7AI**	0.71 ± 0.03	1.3 ± 0.1	5.3×10^5
d**3FB**	d**3FB**	0.94 ± 0.24	0.41 ± 0.06	2.3×10^6
dA	d**3FB**	1.1 ± 0.2	0.27 ± 0.02	4.0×10^6
dC	d**3FB**	0.98 ± 0.27	4.3 ± 0.7	2.3×10^5
dG	d**3FB**	0.80 ± 0.09	2.0 ± 0.2	4.1×10^5
dT	d**3FB**	1.1 ± 0.3	2.3 ± 0.9	4.6×10^5
d**MMO2**	d**5SICS**	0.66 ± 0.01	0.015 ± 0.002	4.5×10^7
d**5SICS**	d**5SICS**	0.66 ± 0.10	0.045 ± 0.004	1.4×10^7
dA	d**5SICS**	0.79 ± 0.11	0.83 ± 0.22	9.5×10^5
dC	d**5SICS**	0.26 ± 0.10	4.4 ± 1.5	6.0×10^4
dG	d**5SICS**	1.0 ± 0.1	1.2 ± 0.2	8.1×10^5
dT	d**5SICS**	1.2 ± 0.2	2.7 ± 0.2	4.5×10^5
d**5SICS**	d**MMO2**	0.51 ± 0.07	0.013 ± 0.003	4.0×10^7
d**MMO2**	d**MMO2**	0.44 ± 0.03	0.060 ± 0.017	7.3×10^6
dA	d**MMO2**	0.81 ± 0.08	0.31 ± 0.02	2.6×10^6
dC	d**MMO2**	1.3 ± 0.2	2.6 ± 0.4	5.1×10^5
dG	d**MMO2**	0.68 ± 0.09	5.7 ± 1.2	1.2×10^5
dT	d**MMO2**	1.3 ± 0.5	1.1 ± 0.3	1.2×10^6

[a]See experimental section for experimental details.

Table S10. Therminator–Mediated Extension of d**X**:d**Y** Pairs[a]

5'–dTAATACGACTCACTATAGGGAGA(**X**)
3'–dATTATGCTGAGTGATATCCCTCT(**Y**)GCTAGGTTACGGCAGGATCGC

X	**Y**	k_{cat} (min^{-1})	K_M (μM)	k_{cat}/K_M (M^{-1} min^{-1})
dA	dT	0.15 ± 0.01	0.044± 0.013	3.4×10^6
dG	dT	0.45 ± 0.10	0.63 ± 0.05	7.1×10^5
d**PICS**	d**PICS**	0.65 ± 0.07	59 ± 12	1.1×10^4
dA	d**PICS**	0.32 ± 0.02	23 ± 1	1.4×10^4
d**7AI**	d**7AI**	0.34 ± 0.04	2.8 ± 0.2	1.2×10^5
dA	d**7AI**	0.35 ± 0.02	40 ± 7	8.7×10^3
dT	d**7AI**	0.45 ± 0.10	16 ± 2	2.8×10^4
d**3FB**	d**3FB**	1.7 ± 0.1	2.2 ± 0.2	7.8×10^5
dA	d**3FB**	0.47 ± 0.08	157 ± 16	3.0×10^3
d**MMO2**	d**5SICS**	0.56 ± 0.14	1.2 ± 0.2	4.6×10^5
d**5SICS**	d**5SICS**	0.47 ± 0.08	104 ± 23	4.5×10^3
dA	d**5SICS**	0.33 ± 0.09	3.7 ± 0.4	8.8×10^4
dG	d**5SICS**	0.51 ± 0.11	3.4 ± 0.6	1.5×10^5
dT	d**5SICS**	0.45 ± 0.13	2.0 ± 0.1	2.3×10^5
d**5SICS**	d**MMO2**	0.60 ± 0.15	2.4 ± 0.9	2.5×10^5
d**MMO2**	d**MMO2**	0.25 ± 0.05	3.7 ± 0.8	6.8×10^4
dA	d**MMO2**	0.22 ± 0.02	151 ± 19	1.5×10^3
dC	d**MMO2**	0.34 ± 0.05	9.7 ± 1.1	3.5×10^4
dG	d**MMO2**	0.24 ± 0.08	201 ± 55	1.2×10^3
dT	d**MMO2**	1.1 ± 0.4	24 ± 4	4.4×10^4

[a]See experimental section for experimental details.

Table S11. Pol β–Mediated Incorporation of Natural and Unnatural Triphosphates dNTPs (d**X**TPs)[a]

5'–dTAATACGACTCACTATAGGGAGA
3'–dATTATGCTGAGTGATATCCCTCT(**Y**)GCTAGGTTACGGCAGGATCGC

X	**Y**	k_{cat} (min^{-1})	K_M (μM)	k_{cat}/K_M (M^{-1} min^{-1})
dA	dT	5.3 ± 0.6	54 ± 8	9.8×10^4
dG	dT	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
d**PICS**	d**PICS**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
dA	d**PICS**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
dC	d**PICS**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
dG	d**PICS**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
dT	d**PICS**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
d**7AI**	d**7AI**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
dA	d**7AI**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
dC	d**7AI**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
dG	d**7AI**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
dT	d**7AI**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
d**3FB**	d**3FB**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
dA	d**3FB**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
dC	d**3FB**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
dG	d**3FB**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
dT	d**3FB**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
d**MMO2**	d**5SICS**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
d**5SICS**	d**5SICS**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
dA	d**5SICS**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
dC	d**5SICS**	0.052 ± 0.010	6.7 ± 0.7	7.8×10^3
dG	d**5SICS**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
dT	d**5SICS**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
d**5SICS**	d**MMO2**	0.20 ± 0.06	120 ± 19	1.6×10^3
d**MMO2**	d**MMO2**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
dA	d**MMO2**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
dC	d**MMO2**	0.14 ± 0.01	22 ± 7	6.1×10^3
dG	d**MMO2**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
dT	d**MMO2**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$

[a]See experimental section for experimental details. [b]Reaction was too inefficient for k_{cat} and K_M to be determined.

Table S12. Pol β–Mediated Extension of d**X**:d**Y** Pairs[a]

5'-dTAATACGACTCACTATAGGGAGA(**X**)

3'-dATTATGCTGAGTGATATCCCTCT(**Y**)GCTAGGTTACGGCAGGATCGC

X	**Y**	k_{cat} (min^{-1})	K_M (μM)	k_{cat}/K_M (M^{-1} min^{-1})
dA	dT	7.3 ± 0.1	34 ± 2	2.1×10^5
dG	dT	0.46 ± 0.01	166 ± 20	2.8×10^3
d**PICS**	d**PICS**	1.7 ± 0.2	177 ± 13	9.7×10^3
dA	d**PICS**	nd[b]	nd[b]	$<1.0 \times 10^3$
dT	d**PICS**	0.26 ± 0.01	191 ± 3	1.3×10^3
d**7AI**	d**7AI**	3.1 ± 0.2	71 ± 11	4.4×10^4
dA	d**7AI**	0.69 ± 0.04	91 ± 2	7.6×10^3
d**3FB**	d**3FB**	8.3 ± 0.6	99 ± 1	8.3×10^4
dA	d**3FB**	1.3 ± 0.1	188 ± 9	6.7×10^3
d**MMO2**	d**5SICS**	2.5 ± 0.2	57 ± 10	4.4×10^4
d**5SICS**	d**5SICS**	3.4 ± 1.0	155 ± 32	2.2×10^4
dA	d**5SICS**	0.98 ± 0.12	254 ± 47	3.9×10^3
dC	d**5SICS**	0.85 ± 0.03	158 ± 10	5.3×10^3
dG	d**5SICS**	0.96 ± 0.08	237 ± 18	4.1×10^3
dT	d**5SICS**	1.2 ± 0.1	279 ± 22	4.4×10^3
d**5SICS**	d**MMO2**	4.7 ± 1.2	12 ± 4	4.0×10^5
d**MMO2**	d**MMO2**	1.1 ± 0.2	94 ± 23	1.2×10^4
dA	d**MMO2**	3.1 ± 0.1	144 ± 2	2.2×10^4
dC	d**MMO2**	2.4 ± 0.2	114 ± 5	2.1×10^4

[a]See experimental section for experimental details. [b]Reaction was too inefficient for k_{cat} and K_M to be determined.

References

1. Leconte, A. M.; Hwang, G. T.; Matsuda, S.; Capek, P.; Hari, Y.; Romesberg, F. E. *J. Am. Chem. Soc*. **2008**, *130*, 2336–2343.

2. Henry, A. A.; Olsen, A. G.; Matsuda, S.; Yu, C.; Geierstanger, B. H.; Romesberg, F. E. *J. Am. Chem. Soc*. **2004**, *126*, 6923–6931.

3. Ogawa, A. K.; Wu, Y.; McMinn, D. L.; Liu, J.; Schultz, P. G.; Romesberg, F. E. *J. Am. Chem. Soc*. **2000**, *122*, 3274–3287.

4. McMinn, D. L.; Ogawa, A. K.; Wu, Y.; Liu, J.; Schultz, P. G.; Romesberg, F. E. *J. Am. Chem. Soc*. **1999**, *121*, 11585–11586.