

*На правах рукописи*



**Гарафутдинов Равиль Ринатович**

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ НОВЫХ АМПЛИФИКАЦИОННО-  
ОПОСРЕДОВАННЫХ МЕТОДОВ АНАЛИЗА  
НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ**

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
доктора химических наук

1.5.4 — биохимия (химические науки)

Новосибирск – 2024

Работа выполнена в лаборатории структуры и функций биополимеров Института биохимии и генетики – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук (ИБГ УФИЦ РАН)

**Научный консультант:**

**Чемерис Алексей Викторович**, д.б.н., профессор, ИБГ УФИЦ РАН, главный научный сотрудник, г. Уфа

**Официальные оппоненты:**

**Филипенко Максим Леонидович**, д.б.н., Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, заведующий лабораторией, г. Новосибирск

**Анненков Вадим Владимирович**, д.х.н., профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Лимнологический институт СО РАН, заместитель директора по научной работе, г. Иркутск

**Сахаров Иван Юрьевич**, д.х.н., профессор, Химический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, ведущий научный сотрудник, г. Москва

Защита диссертации состоится 28 февраля 2025 г. в 12:00 часов на заседании Диссертационного совета ИХБФМ.02.01 при Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН по адресу: 630090, г. Новосибирск, пр. ак. Лаврентьева, 8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН и на сайте <http://www.niboch.nsc.ru>.

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_ г.

Ученый секретарь диссертационного совета, кандидат химических наук



П.Е. Пестряков

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### *Актуальность темы исследования*

Обнаружение специфических нуклеиновых кислот (НК) *in vitro* является основой современных методов молекулярной диагностики различных заболеваний [Rifai, 2017], анализа продуктов питания и объектов окружающей среды [Nieuwkerk et al., 2020], вносит важный вклад при проведении криминалистических расследований [Чемерис и др., 2022]. Большинство методов обнаружения НК включает амплификацию мишени, обеспечивающую накопление аналита до инструментально детектируемого уровня. В качестве НК-мишеней выступают нуклеотидные последовательности, позволяющие однозначно устанавливать происхождение и/или принадлежность того или иного био-/генетического материала. Наиболее популярным методом амплификации НК является полимеразная цепная реакция (ПЦР), характеризующаяся достаточной чувствительностью и специфичностью [Behlke, 2019]. После разработки ПЦР было предложено множество вариантов данной реакции, направленных на решение задач, для которых использование классической ПЦР не приводило к желаемому результату. Достойной альтернативой ПЦР стали методы изотермической амплификации, не требующие термоциклирования, характеризующиеся стабильной работой ферментной системы и возможностью создания портативных диагностических устройств [Бодулев, Сахаров, 2020; Jiang et al., 2023].

Несмотря на имеющиеся достижения, разработка новых способов амплификации и детекции НК продолжается до сих пор. Она обусловлена необходимостью решения двух взаимосвязанных методологических задач: обнаружение "сложных" НК-мишеней и обеспечение при этом максимальной специфичности и чувствительности анализа. Первая задача остается актуальной вследствие расширения спектра НК-содержащих образцов. Так, в последнее время значительное внимание уделяется исследованию короткоцепочечных НК (кцНК), таких как фрагментированные или разрушенные НК (например, древняя ДНК) и микроРНК. Разрушенные НК встречаются не только в биологических объектах, подвергнувшихся воздействию внешних факторов; фрагментация НК происходит при любых манипуляциях: при их выделении, интенсивном перемешивании, фильтрации, замораживании и последующем оттаивании водных растворов. Целенаправленное расщепление ДНК проводят с помощью ультразвука при подготовке ДНК-библиотек для NGS-секвенирования.

В препаратах разрушенных НК содержатся молекулы разной длины, и только часть из них пригодны для амплификации. Возникает ситуация, когда при кажущейся достаточности НК-материала реальное содержание амплифицируемых мишеней в образце существенно ниже. Из-за невозможности точного определения точек расщепления НК-цепей подбор оптимальных нуклеотидных последовательностей мишеней для разрушенных НК затруднен. В связи с этим вопрос о пригодности фрагментированных НК

для амплификационно-опосредованного анализа остается открытым, а их обнаружение представляет собой нетривиальную задачу, требующую методических отклонений от традиционных подходов. Наиболее очевидным её решением является использование системы сближенных праймеров, однако ряд аспектов протекания амплификации с их участием недостаточно изучен. Помимо ПЦР, сближенное расположение праймеров реализуется также в некоторых других методах, например, при амплификации "катыщимся кольцом" (в варианте рамификации). Основной проблемой при использовании сближенных праймеров является сложность дискриминации продуктов неспецифического ДНК-синтеза и целевых ампликонов. Кроме того, для коротких НК-мишеней облегчено образование побочных продуктов амплификации, поскольку кцНК обладают праймероподобными свойствами и обуславливают высокую эффективность фальш-праймирования.

Необходимость обеспечения высокой специфичности и чувствительности обнаружения любых НК-мишеней очевидна, однако достижение требуемых аналитических характеристик в некоторых случаях затруднено. Нередко это связано с особенностями строения и/или свойствами молекулярных компонентов амплификационных систем. Так, обнаруженная недавно предпочтительность расщепления ДНК по определенным сайтам обуславливает необходимость выявления последовательностей, которые в меньшей степени подвержены разрушению под действием механических сил и, как следствие, способны обеспечить бóльшую достоверность анализа. Эффективность и специфичность амплификации НК зависят также от природы используемых полимераз, которые, не будучи абсолютно точным молекулярным инструментом, приводят к ошибкам при репликации и транскрипции как *in vivo*, так и в реакциях амплификации *in vitro*. Появление побочных матриц на начальном этапе амплификации приводит затем к эффективному накоплению нежелательных ампликонов. Проблема неспецифического синтеза ДНК остро проявляется при разработке новых методов изотермической амплификации, которую проводят при температурах, близких к температуре отжига праймирующих молекул, и требующей использования ДНК-полимераз с цепь-вытесняющей активностью. Хотя с развитием подходов молекулярной динамики и квантовой химии началось изучение взаимодействия молекул НК и ДНК-полимераз, результативность *in silico* подходов пока ограничена возможностями вычислительной техники ввиду сложности изучаемых биомолекулярных систем.

Таким образом, многообразие предложенных к настоящему времени способов амплификации НК обусловлено множественностью решаемых задач, появлением новых молекулярных инструментов, возможностью варьирования состава реакционных смесей и условий проведения реакций. Однако дальнейшее развитие направления сдерживается ограничениями, обусловленными свойствами молекулярных компонентов или присущими им недостатками, отсутствием понимания причин протекания ряда побочных процессов в амплификационных системах.

### ***Цель и основные задачи исследования***

Целью работы стали изучение отдельных свойств ключевых молекулярных компонентов амплификационных систем и поиск на основе полученных данных новых подходов к анализу "сложных" НК-мишеней, в первую очередь короткоцепочечных нуклеиновых кислот.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить влияние размера молекул, нуклеотидного контекста и статуса метилирования на расщепление ДНК под действием ультразвука;
2. Исследовать протекание ПЦР со сближенными праймерами, продемонстрировать ее преимущества и применимость для амплификации разрушенных НК-мишеней;
3. Изучить влияние структуры праймеров и присутствия ДНК-матриц на образование димеров праймеров в ходе ПЦР-амплификации;
4. Определить условия протекания и установить механизм мультимеризации ДНК, предложить способы ее устранения;
5. Изучить связывание большого фрагмента ДНК-полимеразы Bst с ДНК и катионами двухвалентных металлов;
6. Предложить новые способы амплификационно-опосредованного анализа НК, в том числе включающие ультразвуковое облучение на этапе пробоподготовки;
7. Разработать способы обнаружения НК, основанные на мультимеризации;
8. Предложить способы повышения эффективности, специфичности и чувствительности реакций амплификации НК.

### ***Научная новизна исследования***

Впервые исследована фрагментация дцДНК под действием ультразвука на модели коротких ДНК (ДНК-ампиконов), показано влияние размера молекул и природы среды на скорость расщепления. Впервые предложено использовать количественную ПЦР для оценки влияния первичной структуры ДНК на характер ее ультразвуковой фрагментации. Получены приоритетные данные о влиянии метилирования цитозина на расщепление ДНК под действием ультразвука. Предложен новый способ сравнительной оценки статуса метилирования ДНК, основанный на ПЦР-амплификации образцов ДНК, подвергнутых облучению ультразвуком.

Детально изучено протекание ПЦР со сближенными праймерами, продемонстрированы ее преимущества в части обеспечения высокой специфичности и чувствительности амплификации "сложных" НК-мишеней. Показана предпочтительность использования данного варианта ПЦР при обнаружении НК в материалах, подвергшихся действию факторов среды или механических сил. Исследованы молекулярные основы и сформулированы рекомендации по недопущению димеризации праймеров в ходе ПЦР.

Обнаружено, что термостабильные и умеренно термостабильные цепь-вытесняющие ДНК-полимеразы способны вызывать мультимеризацию ДНК. На примере большого фрагмента ДНК-полимеразы Bst *exo-* определены

условия, способствующие мультимеризации, предложены способы ее предотвращения. Раскрыт механизм реакции. Показана предпочтительность связывания Bst *exo*- с нуклеотидными последовательностями определенного состава и ее способность обеспечивать эффективную амплификацию ДНК в присутствии альтернативных кофакторов; оценено их влияние на протекание как специфической, так и неспецифической изотермической амплификации.

На основе концепции о предпочтительности использования в реакциях амплификации сближенных праймеров предложено несколько подходов к анализу специфических НК-мишеней, в том числе включающих использование ультразвукового облучения как этапа пробоподготовки. Так, определены параметры проведения ПЦР в стандартных ПЦР-пробирках в режиме термоконвекции. Предложен способ определения половой принадлежности биоматериалов человека путем анализа делеционных полиморфных локусов. Показана применимость мультимеризации для оценки уровня зрелых форм мРНК и обнаружения вирусных РНК. Разработан способ получения небольших одноцепочечных кольцевых ДНК-матриц из разрушенной дцДНК с помощью T4 РНК-лигазы путем внутримолекулярного нематричного лигирования, применимых для амплификации "катящимся кольцом". Предложен способ типирования микродиплотипов, основанный на амплификации "катящимся кольцом" и последующем секвенировании продуктов данной реакции. Разработана компьютерная программа для подбора праймеров для петлевой изотермической амплификации, обеспечивающих ее бóльшую реакционную специфичность.

### ***Теоретическая и практическая значимость работы***

Результаты работы способствуют более глубокому пониманию процессов, происходящих при фрагментации молекул НК под действием механических сил и связанных с протеканием неспецифического ДНК-синтеза при амплификации разрушенных мишеней. Данные о влиянии нуклеотидного контекста на разрушение ДНК по определенным сайтам при облучении ультразвуком должны учитываться при использовании методов, в которых в качестве этапа пробоподготовки применяется ультразвуковая обработка, а также в случаях, когда предполагается нахождение НК во фрагментированном состоянии. Преимущества использования сближенных праймеров могут быть приняты во внимание при планировании работ с короткоцепочечными НК. Данные о неспецифической активности цепь-вытесняющих ДНК-полимераз, в частности, о способности вызывать мультимеризацию ДНК, а также о предпочтительности их связывания с нуклеотидными последовательностями определенного состава позволят разработать подходы, обеспечивающие бóльшую достоверность результатов изотермической амплификации. Полученные данные могут применяться при постановке амплификационных экспериментов, начиная с подбора последовательностей мишеней и праймеров и заканчивая интерпретацией результатов. Они могут найти применение как в научных исследованиях, так и в практике лабораторий экспертизы.

### ***Положения, выносимые на защиту:***

1. При проведении диагностически значимой амплификации разрушенных нуклеиновых кислот определяющим является выбор подходящей мишени, который должен осуществляться с учетом их контекстно-зависимых свойств. Для обнаружения мишени в образцах механически разрушенной ДНК предпочтительнее выбирать участки нуклеотидной последовательности с более высокой плотностью расположения динуклеотидов 5'-CN-3' и длиной до 150 п.о.
2. Наличие 5-метилцитозина обуславливает большую скорость расщепления цепей ДНК под действием ультразвука, при этом максимальное различие в степени фрагментации достигается в начальный период обработки ультразвуком.
3. Использование в ПЦР сближенных праймеров позволяет кратно снизить продолжительность реакции с сохранением ее высокой эффективности. ПЦР со сближенными праймерами характеризуется более высокими специфичностью и чувствительностью, менее чувствительна к действию ингибирующих агентов, способна обеспечить диагностически значимое обнаружение РНК-мишеней с помощью ДНК-полимеразы Taq.
4. Для достижения высокой специфичности амплификации необходимо исключить комплементарность расположенных подряд двух и более 3'-концевых нуклеотидов в праймерах. Присутствие в реакционной смеси любой ДНК способствует накоплению продуктов димеризации даже для праймеров, имеющих два 3'-комплементарных нуклеотида, но не склонных к димеризации в отсутствие ДНК. Для праймеров, способных образовывать относительно прочные димеры, невозможно исключить накопление продуктов димеризации с помощью известных способов.
5. Цепь-вытесняющие ДНК-полимеразы, обладающие умеренной или высокой термостабильностью, приводят к мультимеризации ДНК в условиях, способствующих "дыханию" цепей. Мультимеризация начинается с образования псевдоциклической структуры за счет изгиба свободных 3'-концов цепей ДНК-дуплекса и их отжига на противоположной цепи. Благодаря однозначности протекания мультимеризации возможно использование данной реакции для обнаружения НК-мишеней.
6. ДНК-полимераза Vst ехо- способна обеспечить амплификацию ДНК в присутствии не только ионов  $Mg^{2+}$  и  $Mn^{2+}$ , но также  $Ca^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  и  $Cu^{2+}$ . Она образует более прочные комплексы с пурин-богатыми нуклеотидными последовательностями, что обуславливает для них большую эффективность мультимеризации.

### ***Апробация результатов исследования***

Основные научные результаты диссертационной работы были представлены на II Международной конференции "Физико-химическая биология" (Новосибирск, 2011), Международной конференции "Постгеномные

технологии для биомедицины" (Новосибирск, 2012), III Международной научно-практической конференции "Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине" (Казань, 2012), XXV, XXVII, XXIX, XXX Международных зимних молодежных школах "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии" (Москва, 2013, 2015, 2017, 2018), 38-м Конгрессе ФЕБО "Механизмы в биологии" (Санкт-Петербург, 2013), 19-ой, 20-ой, 22-ой, 24-ой Международных пушинских школах-конференциях молодых ученых "Биология - наука XXI века" (Пушино, 2015, 2016, 2018, 2020), V и VI Съездах биохимиков России (Сочи, 2016, 2019), Всероссийской конференции с международным участием "Биотехнология – медицине будущего" (Новосибирск, 2017), VIII и X Российских симпозиумах "Белки и пептиды" (Москва, 2017, 2021), Мультиконференции "Биотехнология – медицине будущего" (Новосибирск, 2019), XV Международной конференции "Параллельные вычислительные технологии ПаВТ'2021" (Челябинск, 2021), XIII Международной мультиконференции "Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology – BGRS/SB-2022" (Новосибирск, 2022), Всероссийской конференции "Синтетическая биология и биофармацевтика" (Новосибирск, 2022), Всероссийской научной конференции "Геномика и биотехнология для медицины и сельского хозяйства" (Уфа, 2022).

### ***Публикации***

Основные результаты работы опубликованы в 41 статье в рецензируемых журналах, из них в индексируемых в Web of Science/Scopus – 22; получено 4 патента на изобретения, полезные модели и свидетельства о регистрации программ для ЭВМ.

### ***Личный вклад автора***

Автору принадлежит ключевая роль в планировании исследований, обработке полученных данных и их публикации. Представленные в работе данные получены автором лично либо при его непосредственном участии и руководстве. По одной из частей работы под научным руководством автора была защищена диссертация на соискание ученой степени кандидата наук (Галимова А.А., 2017 г.). Использованные в работе модифицированные олигонуклеотиды были синтезированы на коммерческой основе либо соавторами публикаций в рамках выполнения совместных работ. Большинство публикаций по теме диссертационной работы подготовлены с личным участием и определяющим вкладом автора.

### ***Структура и объем работы***

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания экспериментальной части, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 321 странице, содержит 86 рисунков и 52 таблицы. Библиография включает 660 литературных источников.

## ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

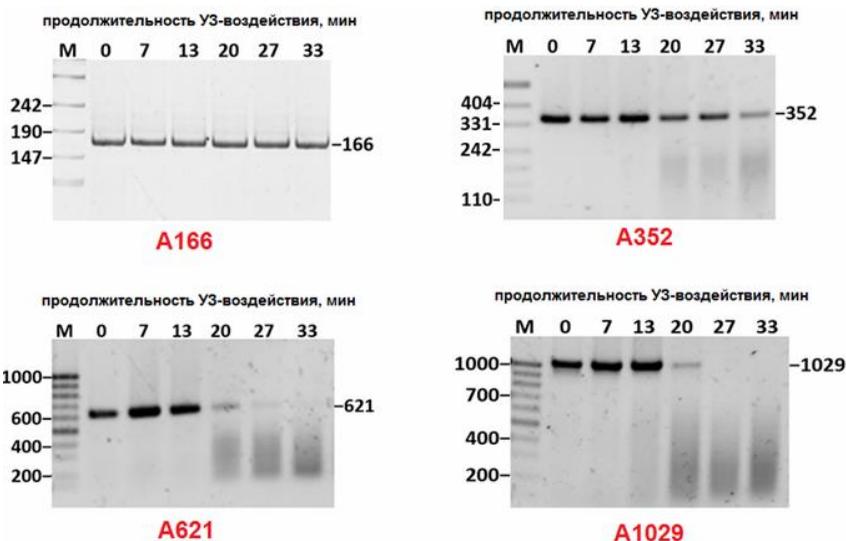
В препаратах разрушенных НК содержатся молекулы разной длины; только часть из них пригодны для амплификации, и при кажущейся достаточности НК-материала содержание амплифицируемых мишеней существенно ниже. Неверное представление о количестве и состоянии НК-мишени может обусловить выбор неподходящего протокола исследования и привести к недостоверному результату. В случае малых РНК размер и последовательность мишеней четко детерминированы, но затруднения обусловлены сложностью конструирования праймерной системы.

### 1. Фрагментация ДНК ультразвуком

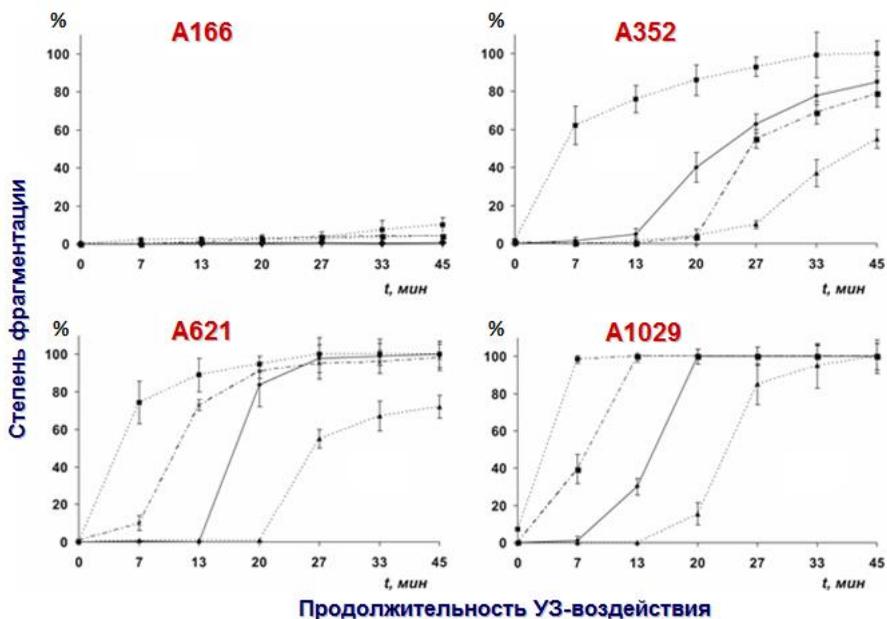
Механическая фрагментация НК происходит при их выделении, при перемешивании, фильтрации, замораживании и оттаивании водных растворов. Целенаправленное разрушение ДНК проводят путем облучения ее растворов ультразвуком (УЗ). В первой части приведены результаты изучения характера УЗ-фрагментации ДНК в зависимости от размера молекул, первичной структуры и статуса метилирования цитозина. УЗ-фрагментации подвергали тотальную ДНК разных организмов и ДНК-ампликоны. Степень фрагментации оценивали с помощью гель-электрофореза и количественной ПЦР (кПЦР).

#### 1.1. Влияние длины молекул на фрагментацию ДНК

Гель-электрофорез недостаточно информативен при оценке влияния условий среды и последовательности на УЗ-фрагментацию тотальной ДНК, поэтому для подобной оценки были взяты ДНК-ампликоны. Их размер и нуклеотидный состав четко детерминированы, что дает определенные преимущества при интерпретации получаемых результатов. Сначала на основе нуклеотидной последовательности гена *28S рРНК* богомола обыкновенного (*Mantis religiosa*) были наработаны ампликоны длиной 166 (А166), 352 (А352), 621 (А621) и 1029 (А1029) п.о., соответственно. Ампликоны конструировали с учетом персистентной длины (Р) ДНК (~50 нм): А166 соответствует 1Р, А352 – 2Р, А621 – 4Р, А1029 – 7Р. Данные ампликоны характеризовались высоким содержанием 5'-CG-3'. УЗ-обработку ампликонов проводили в режиме "high" (320 Вт) при продолжительности до 45 мин, использовали 25 мкл раствора ДНК. А166 не подвергался фрагментации даже спустя 30 мин облучения, для А352, А621 и А1029 заметное разрушение наблюдалось после 20-минутной обработки (рис. 1). Эффективность фрагментации увеличивалась с ростом размера молекул. Для А352 наблюдалась частичная фрагментация: даже после 30 мин облучения сохранялись целые молекулы. Для А621 и А1029 через 0,5 ч воздействия наблюдалось полное разрушение. Показательно, что во всех случаях минимальный размер образующихся фрагментов составлял более 100 п.о. Т.о., молекулы ДНК размером менее одной персистентной длины в В-форме не подвергаются УЗ-фрагментации.



**Рис. 1.** Фрагментация ампликонов A166, A352, A621 и A1029 в водных растворах (M1 – маркер pUC19/MspI, M2 – маркер 100 п.о.).



**Рис. 2.** Влияние состава среды на скорость УЗ-дробления ампликонов: сплошная линия - контроль (водный раствор), пунктирная – 2 М NaCl, точечная – 50%-ный водный этанол, пунктир-точка – 30%-ный водный формамид.

На конформацию двойной спирали могут оказывать влияние компоненты раствора, поэтому изучали расщепление ампликонов в растворах 2 М хлорида натрия, 50%-ного этанола и 30%-ного формамида (рис. 2). A166 не подвергался фрагментации даже спустя полчаса воздействия ни в одном из указанных растворов; лишь в случае 2 М NaCl наблюдалось появление незначительного количества продуктов фрагментации. Разрушение A352, A621 и A1029 существенно ускорялось в присутствии NaCl. Присутствие формамида ускоряло разрушение ампликонов A621 и A1029 и замедляло расщепление A352. Данный агент увеличивает вязкость среды, снижает эффективность образования кавитационных пузырьков и влияет на конформацию молекул ДНК, обеспечивая формирование участков расплетения двойной спирали, т.е. одноцепочечных фрагментов, обладающих большей гибкостью. Снижение скорости расщепления A352 объясняется, возможно, более эффективным расплетением двойной спирали в среде денатурирующего агента. Наличие этанола повышало стойкость к разрушению, по-видимому, за счет нарушения гидратной оболочки и, как следствие, изменения конформации молекул ДНК.

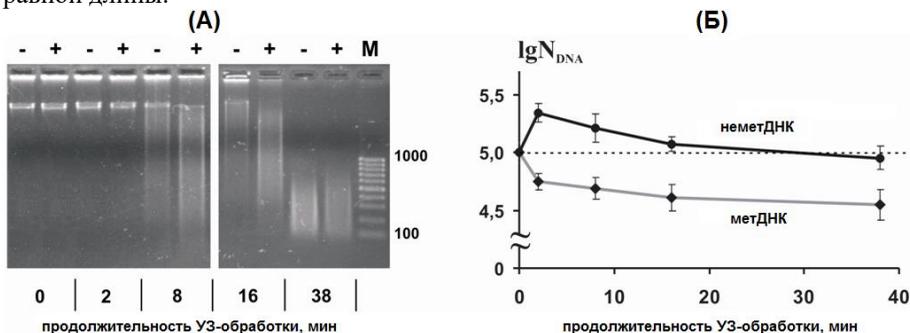
### 1.2. Оценка сиквенс-специфичности фрагментации ДНК

Ранее было показано, что под действием УЗ наиболее эффективно расщепляются фосфодиэфирные связи в сайтах 5'-CN-3', особенно 5'-CG-3' [Grokhovsky et al., 2011]. Однако для относительно коротких молекул ДНК такое влияние, на наш взгляд, не совсем очевидно, поэтому далее изучали разрушение НК на примере тотальной ДНК с помощью кПЦР. В качестве модельного объекта была взята ДНК пчелы медоносной (*Apis mellifera*). В ее геноме были выбраны 18 участков, которые сгруппировали в зависимости от персистентной длины ДНК: участки короче 100 п.о. (менее 1Р), длиной около 150 п.о. (1Р), 300 п.о. (2Р) и 450 п.о. (3Р). Каждая группа была представлена участками с различным количеством 5'-CG-3' и других 5'-CN-3'. Опытный образец ДНК *A.mellifera* был получен смешиванием 100 образцов ДНК, выделенных из грудных мышц рабочих пчел. Этот образец ДНК с концентрацией 3 нг/мкл ( $10^4$  копий мишени/мкл) подвергали серийной УЗ-обработке: краткой (2 мин), средней (8 мин) и продолжительной (38 мин). ПЦР показала снижение количества амплифицируемых мишеней  $N_{DNA}$  для всех областей после продолжительной обработки. Выявлено постепенное снижение  $N_{DNA}$  с увеличением размера амплифицируемой области, что связано с уменьшением количества целых молекул. Для всех областей значения  $N_{DNA}$  незначительно превышали теоретически ожидаемое количество (т.е.  $10^4$  копий) для образцов ДНК после кратковременной УЗ-обработки, что можно объяснить повышением эффективности денатурации укороченных ДНК-матриц и праймирования в ПЦР. Несмотря на различие в количестве 5'-CG-3' в амплифицируемых участках в пределах каждой группы,  $N_{DNA}$  различалась незначительно, что связано, скорее всего, с присутствием еще и 5'-CA-3' и 5'-CT-3'.

В целом, области со средней плотностью 5'-CG-3' (один 5'-CG-3' на ~14 нт цепи) фрагментируются с большей скоростью. Для участков с большей или меньшей плотностью 5'-CG-3' эффективность расщепления снижается, вероятно, из-за локальной жесткости концов ДНК. Максимальное снижение  $N_{DNA}$  ( $\Delta IgN_{DNA}$  ~2-2,4), наблюдалось для двух областей: без 5'-CG-3' и с высокой плотностью 5'-CG-3', что связано со снижением сиквенс-специфичности фрагментации для относительно протяженного участка. Т.о., расположение 5'-CG-3' определяет характер УЗ-расщепления ДНК, но это наблюдение справедливо только для участков размером >1Р. Следовательно, содержание 5'-CN-3' должно учитываться при выборе мишени в случае анализа фрагментированной ДНК; при этом участки без 5'-CG-3' не должны рассматриваться. Небольшой размер ампликона (до ~150 п.о.) и относительно высокое содержание 5'-CN-3' представляются наиболее оптимальными при подборе праймеров для кПЦР-амплификации ДНК, разрушенной УЗ.

### 1.3. Влияние метилирования CpG на фрагментацию ДНК

Поскольку ДНК разрушается при обработке УЗ преимущественно по CpG-сайтам, а метилирование цитозина вызывает локальное увеличение жесткости цепи, предположили, что метилированная ДНК (метДНК) фрагментируется быстрее, чем неметилированная (неметДНК). Для оценки влияния метилирования цитозина на фрагментацию использовали ДНК  $\lambda$ , которую полностью метилировали с помощью CpG метилтрансферазы M.SssI в соответствии с собственным протоколом. Предварительно провели оценку результатов УЗ-фрагментации ДНК  $\lambda$  с помощью гель-электрофореза. Оказалось, что метДНК разрушается быстрее, чем неметДНК (рис. 3А). Максимальная разница в размерах фрагментов наблюдалась после умеренного УЗ-воздействия (16 мин); длительная обработка приводила к фрагментам равной длины.

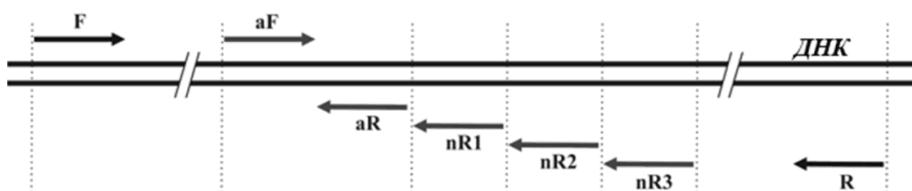


**Рис. 3.** Ультразвуковая фрагментация ДНК  $\lambda$ : (А) различие в размерах фрагментов ДНК (- неметДНК, + метДНК, М – маркер 100 п.о.), (Б) влияние УЗ-обработки на количество амплифицируемых ДНК-мишеней (приведены данные для участка L2; взято в реакцию  $10^5$  копий мишени, стандартные условия ПЦР).

Гель-электрофорез не позволяет оценить сиквенс-специфичность фрагментации, поэтому далее определяли значения  $N_{DNA}$  для обоих типов ДНК фага  $\lambda$ . Были проанализированы девять областей разной длины с различным количеством CpN в них. Максимальное снижение  $N_{DNA}$  наблюдалось для протяженных участков. Для большинства участков максимальное различие между  $N_{DNA}$  для неметДНК и метДНК было получено при минимальной по продолжительности УЗ-обработке (от 2 до 8 мин), несмотря на то, что согласно данным гель-электрофореза, в течение этого времени ни метДНК, ни неметДНК не разрушались до коротких фрагментов. Для всех областей после кратковременной УЗ-обработки значение  $N_{DNA}$  несколько увеличивалось для неметДНК по сравнению с количеством исходной ДНК, в то время как для метДНК оно сразу снижалось (рис. 3Б). Т.о., расщепление ДНК по метилированному CpG-сайту является более предпочтительным.

## 2. ПЦР-амплификация с использованием сближенных праймеров

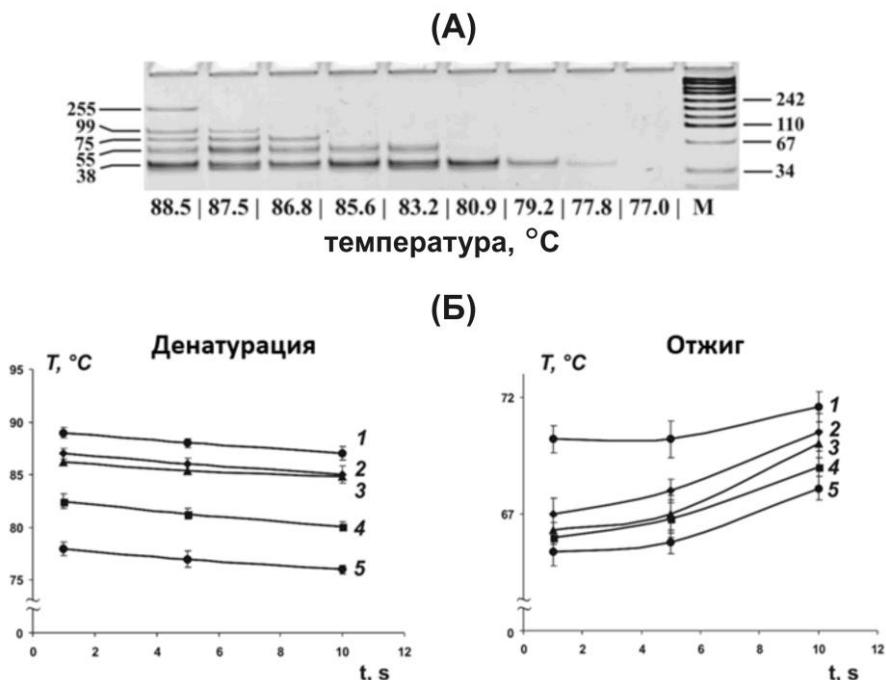
Для изучения особенностей протекания ПЦР со сближенными праймерами к уникальным последовательностям ДНК *A. mellifera*, *M. religiosa*, человека (*Homo sapiens*), лиственницы Сукачёва (*Larix sukaczewii*), ели сибирской (*Picea obovata*), сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris*), дуба обыкновенного (*Quercus robur*), липы сердцевидной (*Tilia cordata*) подбирали пары видоспецифичных праймеров двух типов: “классические” прямой (F) и обратный (R) для “традиционной” ПЦР, и прямой (aF) и обратный (aR) праймеры, расположенные встык друг к другу. К ДНК пчелы и человека было подобрано еще по три обратных праймера (nR1, nR2 и nR3), расположенных на расстоянии от парного им прямого. Ожидаемая длина ампликонов для пар F/R варьировала в диапазоне 255-299 п.о., для aF/aR – 38-47 п.о., а для aF/nR – 55-121 п.о. (рис. 4).



**Рис. 4.** Места отжига “классических” (F/R), сближенных (aF/nR1/nR2/nR3) праймеров и праймеров “встык” (aF/aR).

Сближенное расположение праймеров определяет ряд преимуществ, влияющих на специфичность и чувствительность амплификации. Малый размер ампликонов не должен требовать высокой температуры и длительности денатурации. Также отсутствует необходимость продолжительной элонгации. Был проведен ряд экспериментов с варьированием программ амплификации. Временной режим оптимизировали, используя ДНК *A. mellifera* и праймеры

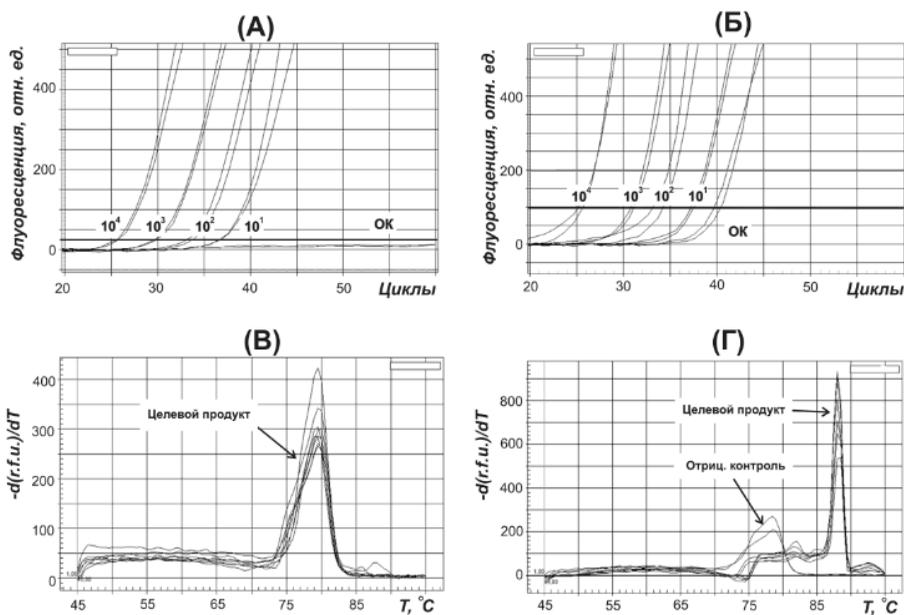
"встык" (AM aF/AM aR), фиксированное число циклов (30 циклов) и  $10^4$  копий мишени. Для успешной ПЦР-амплификации с праймерами "встык" оказалось достаточно программы, состоящей из циклов продолжительностью 1-5-1 с для этапов денатурации, отжига и элонгации. Далее были найдены пороговые значения температуры, обеспечивающие эффективное протекание ПЦР. Их определяли по отсутствию соответствующих ПЦР-продуктов в геле (рис. 5А).



**Рис. 5.** Оптимизация температурного режима ПЦР со сближенными праймерами (ДНК *A. mellifera*,  $10^4$  копий мишени). (А) Электрофоретическое определение пороговых температур денатурации (для денатурации продолжительностью 1 с). ПЦР образцы содержали пять пар праймеров: AM F/AM R, AM aF/AM aR, AM aF/AM nR1, AM aF/AM nR2, AM aF/AM nR3; М – маркер pUC19/MspI. (Б) Температурные профили денатурации и отжига. Пары праймеров: 1 – AM F/AM R, 2 – AM aF/AM nR3, 3 – AM aF/AM nR2, 4 – AM aF/AM nR1, 5 – AM aF/AM aR.

Для сокращенной программы (1-5-1 с) температурный предел этапа денатурации в случае классических праймеров составил около  $90^\circ\text{C}$ , в то время как для праймеров "встык" – около  $80^\circ\text{C}$  (рис. 5Б). Для сближенных праймеров (aF-nR) пороговые температуры денатурации оказались в диапазоне  $80-90^\circ\text{C}$ , а отжига составили  $70-71^\circ\text{C}$  и  $65-67^\circ\text{C}$ , соответственно, при расчетной температуре  $59-60^\circ\text{C}$ . Т.о., праймеры "встык" позволяют существенно сократить продолжительность ПЦР-амплификации за счет уменьшения времени, необходимого прибору для термоциклирования.

При проведении ПЦР-амплификации с праймерами "встык" заметили, что они обеспечивают более высокую чувствительность реакции. На рисунке 6 приведен пример амплификации фрагмента однокопийного гена "бескрылости" *M. religiosa Wnt-1* с использованием пар праймеров "встык" (MR aF/MR aR) и с традиционным расположением (MR F/MR R). При использовании праймеров "встык" образцы отрицательного контроля (ОК) не показывали подъема даже после 60 цикла (рис. 6А), в то время как для "традиционных" праймеров такой подъем наблюдался, видимо, вследствие образования неспецифических продуктов (рис. 6Б). В приведенном примере использование праймеров "встык" позволило выявить единичные копии мишени (<10), в то время как для классических предел обнаружения составил  $10^2$  копий. Кривые плавления показали образование целевых ампликонов в опытных образцах для обеих пар, однако для классических праймеров наблюдалась наработка неспецифических продуктов в ОК (рис. 6В и 6Г).



**Рис. 6.** Чувствительность ПЦР в реальном времени (ДНК *M. religiosa*, стандартные условия ПЦР). (А, В) – праймеры встык (MR aF/MR aR), (Б, Г) праймеры с традиционным расположением (MR F/MR R). А, Б – кривые амплификации (указано количество копий мишени ( $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$ ), ОК – отрицательный контроль), В, Г – кривые плавления.

Для оценки характера протекания ПЦР со сближенными праймерами в присутствии ингибиторов использовали праймеры, подобранные к ДНК *L. sukaczewii*. Лиственница – хвойное растение, характеризующееся высоким

содержанием фенольных соединений и терпеноидов, обладающих значительной ПЦР-ингибирующей способностью. При выделении ДНК из хвои *L.sukaczewii* ЦТАБ-методом препараты содержат примеси этих соединений. ПЦР с праймерами к высококопийной последовательности внутреннего транскрибируемого спейсера 1 (*ITS1*) эффективно протекала только для праймеров "встык" (LS aF/LS aR), что позволило обнаружить ДНК *L.sukaczewii* почти во всем диапазоне 10-кратных разведений (табл. 1). Для ДНК лиственницы, выделенной с помощью коммерческого набора, заметного ингибирования ПЦР не наблюдалось.

**Таблица 1.** Влияние расположения праймеров на величину пороговых циклов  $C_t$ , найденных после ПЦР-амплификации ДНК *L.sukaczewii* с помощью праймеров "встык" LS aF/LS aR и с традиционным расположением LS F/LS R (стандартные условия ПЦР).

Кол-во ДНК, нг	Разведение	Примерное число копий мишени*	Пороговый цикл $C_t$ (номер кривой/дорожки)			
			метод выделения №1**		метод выделения №2**	
			LS aF/LS aR	LS F/LS R	LS aF/LS aR	LS F/LS R
20	10 <sup>0</sup>	1000	19,0±1,0	–	22,0±1,0	24,0±0,0
2	10 <sup>-1</sup>	100	27,5±1,0	36,0±2,0	25,0±1,0	28,0±1,0
0,2	10 <sup>-2</sup>	10	31,0±2,0	40,0±3,5	28,5±1,0	31,5±2,0
0,02	10 <sup>-3</sup>	1	38,0±4,0	44,5±4,5	35,0±3,0	37,0±3,0
0,002	10 <sup>-4</sup>	0,1	–	45,5±4,0	–	40,0±3,0
0	–	0	–	45,5±5,0	–	41,5±4,0

\* указан порядок величины.

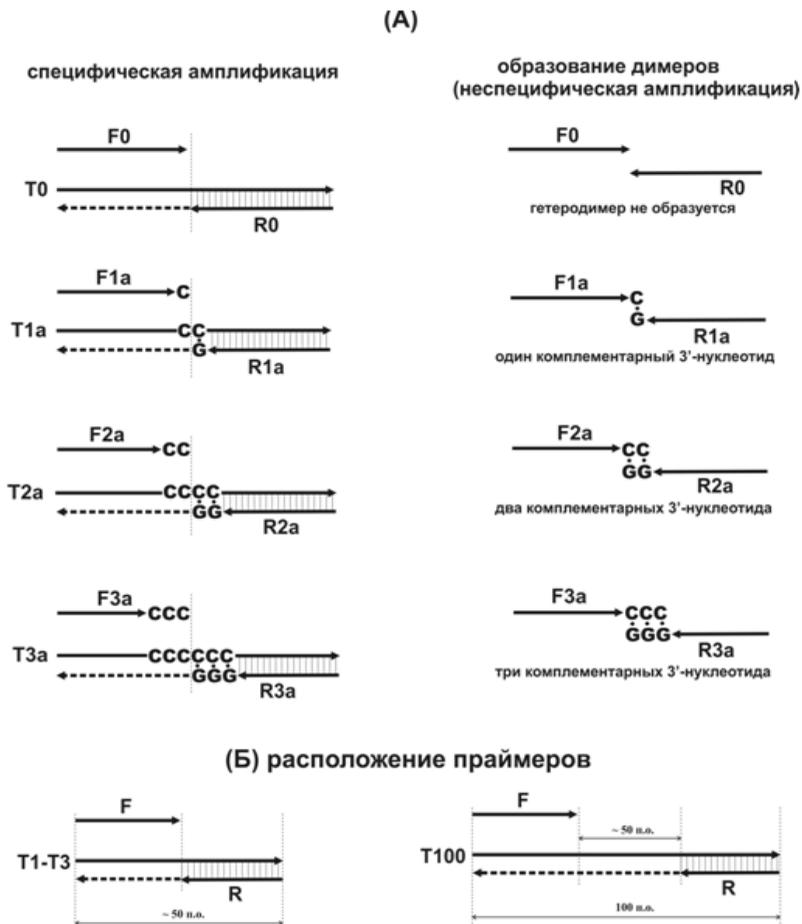
\*\* метод выделения №1 – ЦТАБ-метод, метод выделения №2 – с помощью коммерческого набора для выделения GeneJET (TFS).

С учетом совокупности данных, полученных для разных молекулярных систем, можно отметить, что праймеры "встык" обеспечивают ПЦР-анализ в тех случаях, когда амплификация мишени с использованием удаленных праймеров (>200 п.о.) затруднена или невозможна.

### 3. Димеризация праймеров в ПЦР

Сближенные праймеры обеспечивают наработку целевых ампликонов, размер, подвижность в геле и температура плавления которых практически идентичны таковым у димеров праймеров (ПД). Анализ результатов амплификации методом гель-электрофореза или в реальном времени становится в этом случае затруднительным или невозможным. Нами детально изучена димеризация праймеров в ПЦР. Сначала исследовали образование ПД с использованием синтетических ДНК-матриц. Были сконструированы модельные наборы праймеров F0/R0, F1/R1, F2/R2, F3/R3. Пара F0/R0 не

образует димерные вторичные структуры; F1/R1, F2/R2 и F3/R3 содержали на 3'-концах 1, 2 или 3 комплементарных нуклеотида, соответственно, которые обеспечивают перекрытие 3'-концов и образование гетеродимеров (рис. 7А).

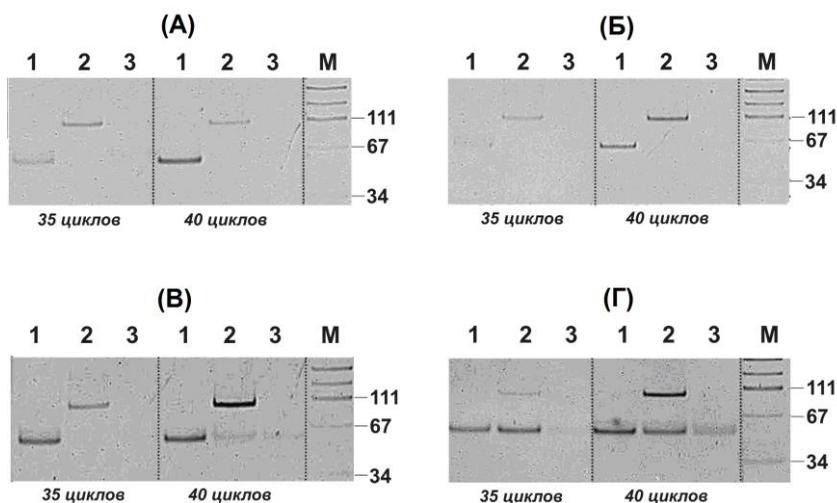


**Рис. 7.** Система "димеризующихся" праймеров. (А) отжиг праймеров на матрицах и друг на друге ("димеризация"). (Б) Отжиг праймеров на коротких и универсальной матрицах.

Наборы F1/R1, F2/R2 и F3/R3 включали несколько пар праймеров (обозначены буквами a, b, c и d), которые могут образовывать гетеродимеры с различной термостабильностью. Были сконструированы соответствующие короткие одноцепочечные ДНК-матрицы T0, T1, T2 и T3, обеспечивающие максимальное сближение праймеров при отжиге, а также более протяженная

универсальная ДНК-матрица T100, на которой все праймеры отжигаются по ее концам, давая продукт размером около 100 п.о. (рис. 7Б). Структуры праймеров и матриц были подобраны таким образом, чтобы обеспечить образование гетеродимеров, но не гомодимеров и шпилек.

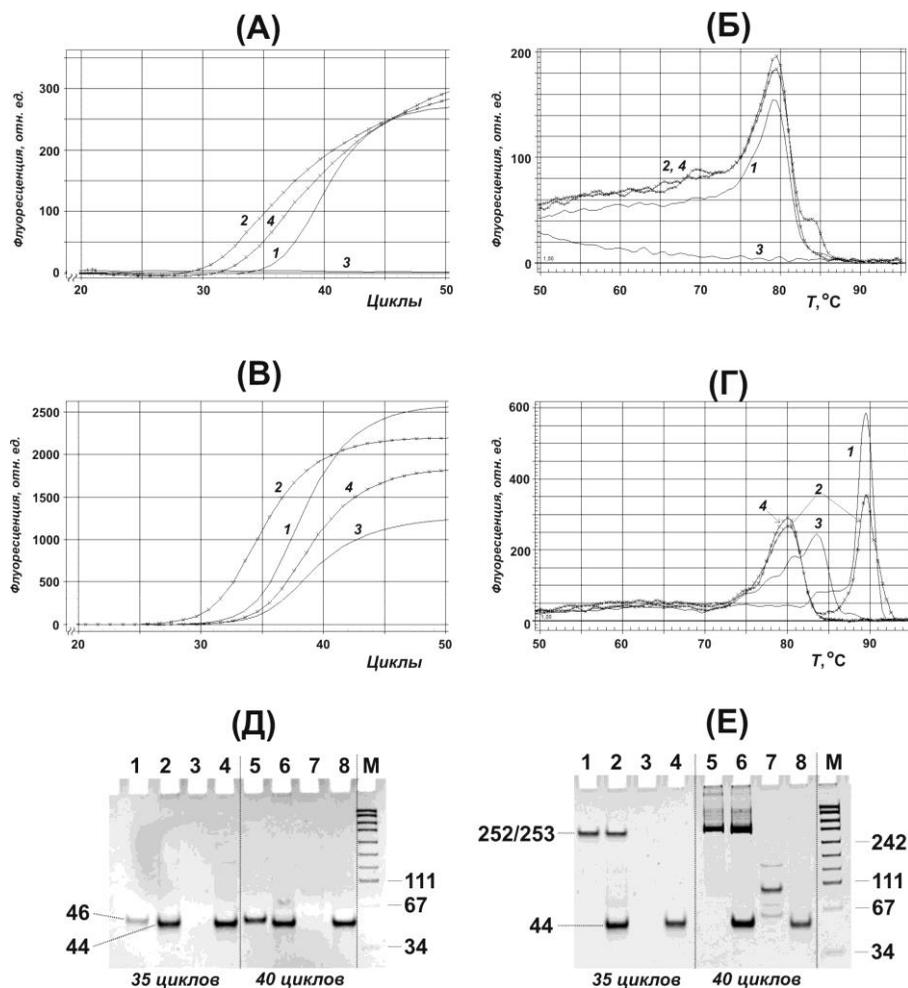
Праймеры в парах 1, 2 и 3 имеют комплементарные 3'-нуклеотиды, поэтому они могут и отжигаться на матрицах, и образовывать гетеродимеры. Найдено, что F0/R0 и обе пары F1/R1 не образуют димерных продуктов даже после длительной (>40 циклов) амплификации (рис. 8А и 8Б, дорожки 3 и 6). Среди группы праймеров F2/R2 слабое накопление ПД замечено только для пары F2a/R2a после 40 цикла реакции для образцов, содержащих T100 (рис. 8В, дорожка 5). Димеризация преобладала над образованием целевого продукта для всех пар F3/R3 (рис. 8Г, дорожка 2), а длительная амплификация приводила к ПД и в образцах ОК (рис. 8Г, дорожка 6). Наиболее стабильный гетеродимер (F3a/R3a) обеспечивал более эффективное накопление ПД в опытных образцах (рис. 8Г, дорожки 2 и 5) по сравнению с ОК (рис. 8Г, дорожки 3 и 6). Таким образом, впервые показано, что присутствие молекул ДНК-матрицы ускоряет образование ПД.



**Рис. 8.** ПЦР с модельными парами праймеров ( $10^3$  копии соответствующих ДНК-матриц, стандартные условия ПЦР): (А) – праймерная пара F0/R0; (Б) – F1a/R1a; (В) – F2a/R2a; (Г) – F3a/R3a; дорожки: 1 – ПЦР-амплификация соответствующей ДНК-матрицы (Т0-Т3), 2 – ПЦР-амплификация ДНК-матрицы T100, 3 – ОК.

Далее изучали димеризацию праймеров с использованием геномной ДНК. Для этого амплифицировали фрагмент гена *Wnt-1* с помощью двух пар праймеров "встык": без комплементарных 3'-нуклеотидов (MR aF/MR aR) и с 3'-перекрывающимися 5'-AG-3' и 5'-CT-3' (MR aF2/MR aR2). Обе пары приводят к специфическим ампликонам одинакового размера (46 п.о.). Также

были сконструированы две пары обычных праймеров: без комплементарных 3'-концевых нуклеотидов (MR F/MR R, продукт длиной 252 п.о.) и с 3'-перекрывающимися динуклеотидами 5'-GA-3' и 5'-TC-3' (MR aF2/MR R2 продукт длиной 253 п.о.). При проведении ПЦР для пары MR aF2/MR aR2 наблюдали подъем кривых как в опытных образцах, так и в ОК, в то время как для праймеров "встык", не залипающих 3'-концами – только в опытных образцах (рис. 9А).



**Рис. 9.** Димеризация праймеров в ПЦР с ДНК *M. religiosa* (стандартные условия ПЦР). (А) Амплификация с праймерами "встык": 1 и 3 – пара MR aF/MR aR, 2 и 4 – пара MR aF2/MR aR2; (Б) профили плавления ПЦР-продуктов, полученных с праймерами "встык"; (В) амплификация с "классическими" праймерами: 1 и 3 –

пара MR F/MR R, 2 и 4 – пара MR aF2/MR R2; (Г) профили плавления ПЦР-продуктов, полученных с "классическими" праймерами (представлено по одной кривой из двукратных повторов). Гель-электрофоретический анализ результатов ПЦР: дорожки 1, 2, 5, 6 – опытные образцы (число копий мишени –  $10^3$ ), 3, 4, 7, 8 – контрольные образцы без ДНК: (Д) дорожки 1, 3, 5, 7 – праймеры MR aF/MR aR, 2, 4, 6, 8 – MR aF2/MR aR2; (Е) 1, 3, 5, 7 – праймеры MR F/MR R, 2, 4, 6, 8 – MR aF2/MR R2.

В первом случае кривые характеризовались сглаженностью и меньшими значениями величины  $S_t$ , что свидетельствует о параллельном протекании амплификации не только целевой ДНК-мишени, но и димера. Отсутствие подъема кривых в образцах ОК для праймеров MR aF/MR aR вплоть до 50 цикла свидетельствует об абсолютной специфичности амплификации. Однако для праймеров "встык" кривые плавления не позволяют дискриминировать целевые продукты и ПД (рис. 9Б). Аналогичный характер амплификации наблюдался и для праймеров с традиционным расположением. Единственное отличие заключалось в том, что для ПЦР с праймерами, не залипающими 3'-концами, подъем кривых происходил и для образцов ОК за счет образования прочих неспецифических продуктов (рис. 9В и 9Г). Из двух пар праймеров "встык" только та, в которой праймеры способны отжигаться друг на друге, приводила к образованию продукта димеризации длиной 44 п.о. (рис. 9Д). Аналогичный результат был получен для пар праймеров с традиционным удалением (рис. 9Е).

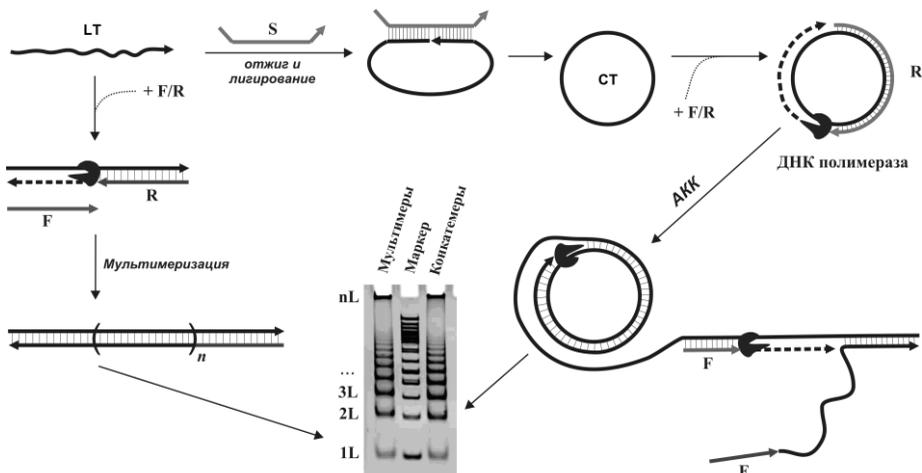
#### ***4. Неспецифическая изотермическая амплификация (мультимеризация)***

Для проведения изотермической амплификации применяют ДНК-полимеразы с цепь-вытесняющей активностью, которые обеспечивают эффективное накопление нежелательных ампликонов в отсутствие мишени.

##### *4.1. Условия, способствующие мультимеризации ДНК*

Одной из разновидностей реакций неспецифического синтеза ДНК, протекающих в изотермических условиях, является мультимеризация (ММ), которая заключается в образовании протяженных дцДНК – мультимеров, содержащих олигонуклеотидные повторы [Hafner et al., 2001]. Нами для изучения ММ была сконструирована модельная система, состоящая из короткой линейной оцДНК (линейная матрица, ЛМ, LT) и двух праймеров. Были сконструированы матрицы размером от 40 до 100 нт, а также прямые (F) и обратные (R) праймеры к ним. В качестве контроля использовали амплификацию катящимся кольцом (АКК); для этого из ЛМ получали кольцевые матрицы (КМ, СТ) с помощью лигирования на поддерживающих пробах S (рис. 10). Было синтезировано несколько систем модельных матриц и праймеров. Первая включала две короткие матрицы LT1 и LT2, на которых праймеры LT F и LT R1 отжигаются "встык" и дают продукты длиной 40 и 50

п.о. соответственно. Вторая группа включала матрицы LT3-LT12, размер которых варьировал в диапазоне 55-100 нт (с шагом в 5 нт). Праймеры LT F и LT R(2-6), подобранные к этим матрицам, отжигались по их концам. Третий комплект включал матрицы LT42-LT60, размер которых менялся от 42 до 60 нт, и праймеры к ним LT F42- LT F60 и LT R42-LT R60, отжигающиеся на этих матрицах "встык". Эффективность амплификации выражали в Tt (пороговое время, в мин).



**Рис. 10.** Упрощенная схема получения кольцевых ДНК и изотермической амплификации линейных (LT) и кольцевых (CT) матриц. F/R – праймеры, S – поддерживающая проба, nL – размеры продуктов ампликации.

Сначала изучили эффективность протекания АКК и ММ для матриц разной длины. Было обнаружено, что АКК протекает для матриц длиной 50, 55, 60, 75, 85, 95 и 100 нт и не наблюдается для матриц размером 40, 65, 70, 80 и 90 нт. Далее оценили протекание ММ для матриц LT42-LT60. Все они привели к накоплению продуктов ММ, при этом эффективность ММ увеличивалась с ростом длины матрицы, достигнув максимума для LT51. Далее определили первичную структуру мультимерных продуктов, полученных на основе LT2 (50 нт) и LT4 (60 нт). Единичные вставки во всех случаях полностью повторяли последовательность матрицы, в то время как мультимерные вставки представляли собой последовательности, состоящие из однонаправленных повторов и имеющие делеции в местах стыков. Размер делеций в пределах одной вставки был в основном постоянным, и большинство делеций имели длину 2-9 нт.

Вопрос о том, является ли способность вызывать ММ общим свойством цепь-вытесняющих ДНК-полимераз, оставалась открытым, поэтому оценили возможность протекания ММ еще для нескольких полимераз с различной

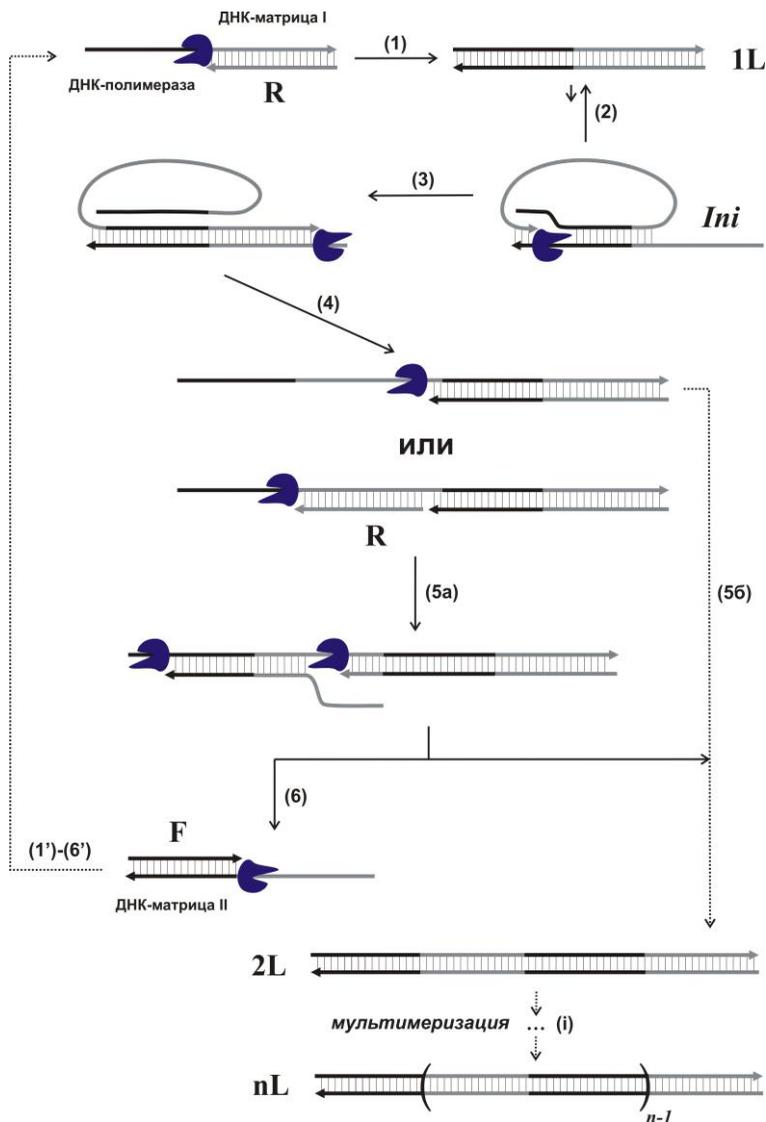
термостабильностью: фрагмент Кленова, Bsu *exo*- (оптимум около 30-37°C), Bsm *exo*- (60-65°C), Vent *exo*-, 9°Nm, Terminator и Hemo KlenTaq (НКТ) (72-75°C). У полимераз фрагмент Клёнова, Bsu *exo*-, Bsm *exo*- и Terminator способность к ММ не была обнаружена. Полимеразы Vent *exo*- и НКТ обеспечили протекание ММ в относительно узком интервале температур. Наибольшей склонностью вести неспецифический ДНК-синтез обладает 9°Nm. Т.о., способность к ММ присуща многим термостабильным и умеренно термостабильным цепь-вытесняющим ДНК-полимеразам, у которых температурный оптимум активности близок к температуре, при которой обеспечивается наибольшая эффективность "дыхания" цепей ДНК.

#### 4.2. Механизм мультимеризации ДНК

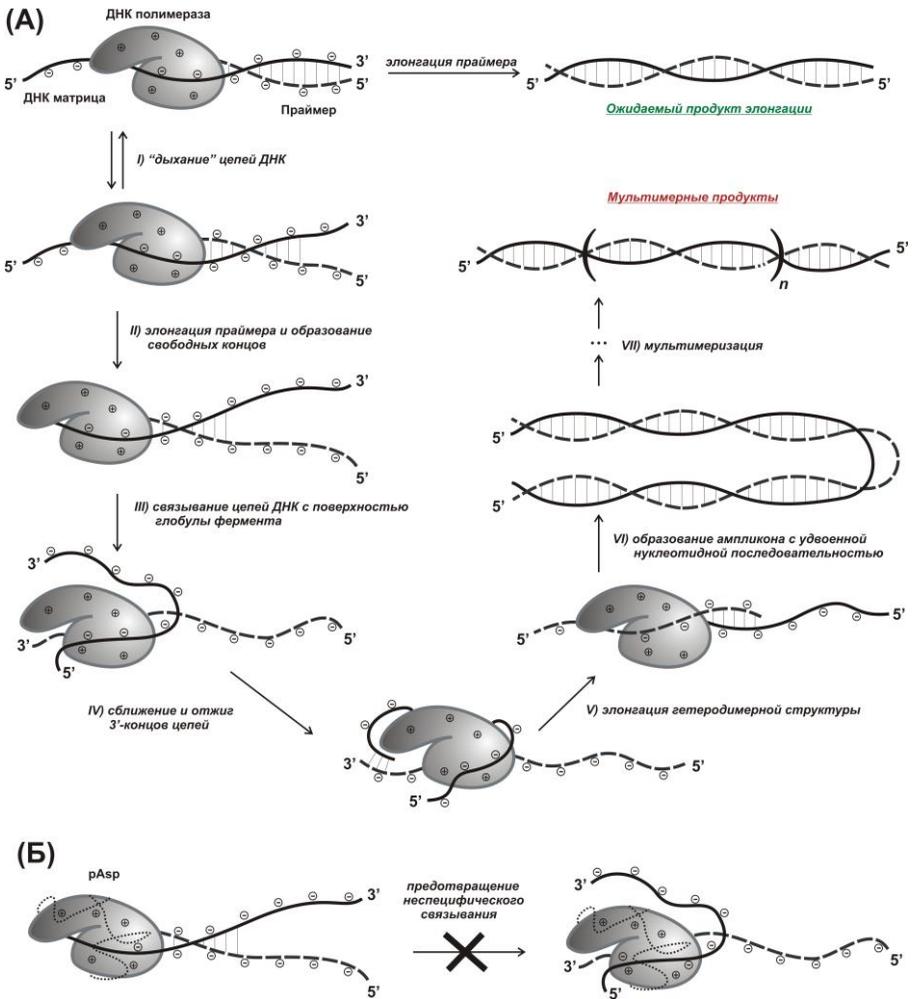
Согласно гипотезе, выдвинутой Wang et al., ММ включает в себя образование псевдоциклической ДНК-структуры, что приводит к удлинению начальной матрицы и появлению дополнительных сайтов отжига праймеров [Wang et al., 2017]. На основании имеющихся данных можно предположить, что ММ протекает согласно схеме, представленной на рисунке 11. Ключевым этапом ММ является образование ДНК-структуры *Ini* за счет "дыхания" цепей ДНК и их изгиба вследствие ионного взаимодействия между фосфатным остовом ДНК с поверхностными аминогруппами полимеразы (рис. 12А). В результате ДНК "обволакивает" фермент, 3'-концы сближаются, гетеродимер удлиняется, образуется продукт с повторяющейся последовательностью, что далее способствует протеканию ММ.

Если приведенный механизм ММ верен, то реакцию можно предотвратить с помощью анионных полиэлектролитов (рис. 12Б). Для подтверждения этого предположения использовали в качестве модельного анионного полиэлектролита поли(аспарагиновую) кислоту pAsp в виде натриевой соли с разной молекулярной массой: 0,9, 3,9 и 6,8 кДа. "Рабочий" в условиях изотермической амплификации диапазон концентрации pAsp составил 0,1-0,01%, поэтому для оценки влияния pAsp на ММ брали препараты с содержанием pAsp 0,1, 0,05 и 0,01%. В качестве контроля использовали L-аспарагиновую к-ту, чтобы доказать, что pAsp связывается с ферментом и предотвращает неспецифическую амплификацию за счет полимерной структуры. Аспарат натрия в концентрации, эквивалентной мономерам pAsp, не влиял на скорость амплификации, тогда как pAsp предотвращал или существенно снижал эффективность ММ.

Для прямого доказательства механизма ММ провели эксперимент, в котором в образцах содержались отличающиеся последовательностью две матрицы LT51 и LTc. В случае, если *Ini* образуется исключительно за счет изгиба исходной ДНК-матрицы, должны были образоваться мультимеры, содержащие последовательность только одной матрицы (рис. 13, путь 1). Если *Ini* образуется за счет отжига на противоположной цепи 3'-конца любой подходящей ДНК (рис. 13, путь 2), то должны были образоваться мультимеры, содержащие последовательности разных матриц.

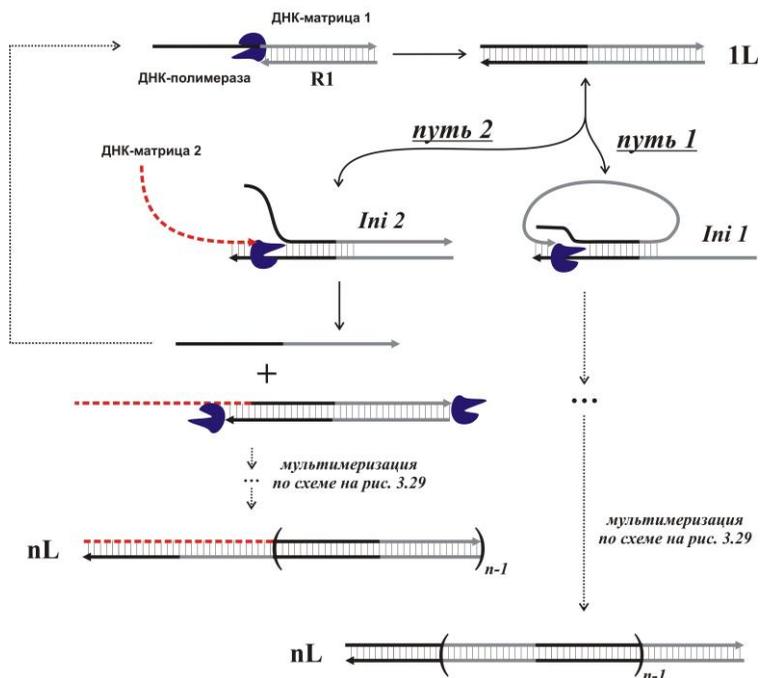


**Рис. 11.** Схема ММ: отжиг и удлинение праймера R на ДНК-матрице I, приводящие к образованию продукта 1L (этап 1), образование ДНК-структуры *Ini* (этап 2), элонгация цепей в *Ini*, формирование продукта 2L (этапы 3, 4 и 5б) или отжиг и элонгация праймера R (этапы 3, 4 и 5а), образование матрицы II (этап 5а), вытеснение ДНК-матрицы II и отжиг на ней праймера F (этап 6), формирование ампликонов с тандемными нуклеотидными последовательностями (этапы *i*). Праймер F и комплементарные ему участки показаны черным цветом, праймер R и комплементарные ему участки – серым.



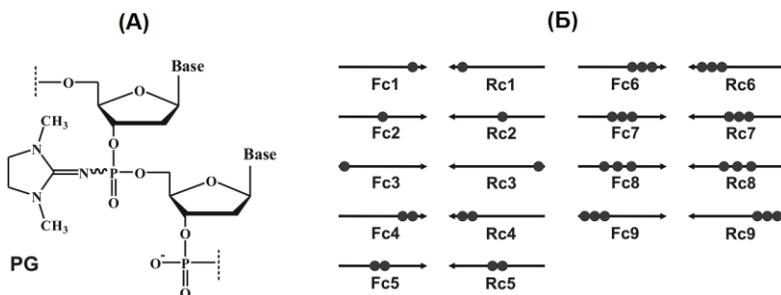
**Рис. 12.** Механизм ММ: (А) схема неспецифического взаимодействия полимеразы Bst exo- с ДНК и формирования псевдоциклической ДНК структуры. (Б) экранирование глобулы фермента с помощью полиаспарагиновой кислоты (pAsp).

NGS-секвенирование показало, что мультимеры, полученные для смеси LT51+LTс, содержат последовательность только одной матрицы. Т.о., ММ запускается по пути 1, что подтверждает справедливость предложенного механизма реакции.



**Рис. 13.** Схема протекания ММ в присутствии двух разных линейных матриц.

Поскольку ММ протекает через образование *Ini*, ее ингибирование возможно путем предотвращения формирования или инактивации *Ini*. Одним из способов ингибирования является использование праймеров с модификациями, препятствующими продвижению ДНК-полимеразы вдоль цепей ДНК. В качестве таковых брали праймеры с фосфорилгуанидиновыми группами (ФГ) (рис. 14А).



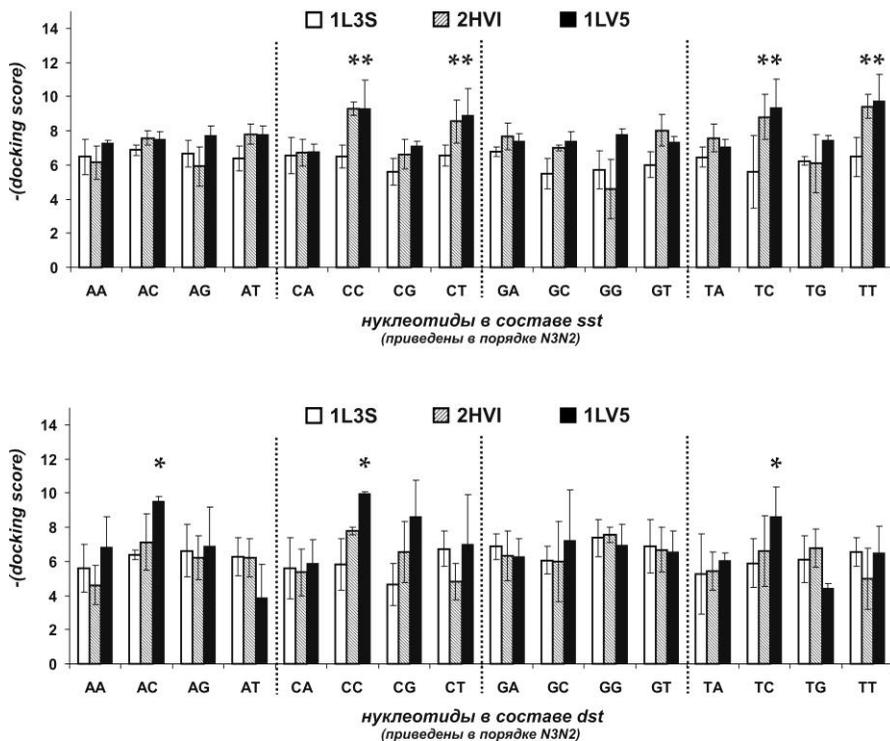
**Рис. 14.** Структура праймеров, использованных для предотвращения ММ: (А) модифицированный межнуклеозидный фосфат, несущий 1,3-диметил-2-иминоимидазолидиновые фрагменты (группа PG); (Б) расположение модификаций (темные кружки) в соответствующих парах праймеров.

Влияние ФГ-модификаций на способность полимеразы *Bst* *exo-* вести синтез ДНК-цепей было неизвестно, поэтому синтезировали несколько праймеров с одним, двумя или тремя модифицированными фосфатами вблизи 3'- и 5'-концов и по центру цепи (рис. 14Б). Для всех вариантов расположения ФГ теоретически можно было бы ожидать ингибирования ММ. Однако ФГ-модификации вблизи 5'-конца праймеров не влияли на эффективность амплификации как линейной, так и кольцевой матрицы. Одна ФГ-группа рядом с 3'-концом праймера незначительно затрудняла амплификацию, тогда как две группы существенно ее затрудняли, а три – полностью ингибировали. Кроме того, наблюдалось полное ингибирование амплификации для всех смешанных пар с любым праймером из пары Fc6/Rc6. Наиболее значимый результат был получен для пары Fc7/Rc7 (три ФГ-группы в середине обоих праймеров), которая полностью предотвращала ММ, при этом специфическая амплификация не ингибировалась.

#### 4.3. Предпочтительность связывания *Bst* *exo-* с ДНК

При изучении ММ с ДНК-матрицами одинаковой длины, но разного нуклеотидного состава, случайно заметили различие во времени начала экспоненциальной стадии реакции (ЭСР). Вероятно, прочность связывания *Bst* *exo-* с теми или иными нуклеотидами для матриц с разным составом варьирует настолько, что может обуславливать различие в скорости образования и/или стабильности соответствующих фермент-субстратных комплексов, иницирующих неспецифический ДНК-синтез. Для проверки справедливости этого предположения изучили комплексы полимеразы *Bst* *exo-* с ДНК с помощью молекулярного докинга, который проводили в трехнуклеотидном приближении для трех конформационных форм *Bst* *exo-*: "открытой" (PDB: 1L3S), "полуоткрытой" (2HVI) и "закрытой" (1LV5). В качестве ДНК выступали все 64 варианта одноцепочечных тринуклеотидов (далее *sst*) и 64 варианта динуклеотидных дуплексов с одним "свисающим" 5'-концевым нуклеотидом (далее *dst*). Расчеты проводили для всех возможных вариантов фермент-субстратных комплексов (384 варианта). Они позволили получить значения *glide emodel*, *potential energy* и *docking score*, характеризующие прочность молекулярных структур. В случае *sst* величина *docking score* принимала значения от -8,147 до -3,150 для 1L3S, от -10,413 до -2,451 для 2HVI и от -11,485 до -6,179 для 1LV5, в случае *dst* – от -8,617 до -1,944, от -8,733 до -2,470 и от -10,969 до -1,626, соответственно. В целом, средние значения *docking score* как для *sst*, так и для *dst*, оказались достаточно близки и не наблюдалось явной предпочтительности связывания полимеразы с определенными тринуклеотидами. Однако после нахождения средних значений *docking score* при рассмотрении только ключевых нуклеотидов (центрального, N2, как связанного с 3'-концевым нуклеотидом растущей цепи, и N3 (5'-концевого), как определяющего тип присоединяемого к растущей цепи нуклеотида) предпочтительность связывания проявилась четче. Более прочными оказались комплексы, содержащие пиримидиновые нуклеотиды: dC

и dT в положениях N2 и N3 для sst, и dC в положении N2 для dst (рис. 15). Наиболее ярко зависимость прочности взаимодействия фермента с ДНК от нуклеотидного контекста выражена для "закрытой" формы полимеразы 1LV5 с dst. Согласно расчетам, для данных комплексов получен наибольший разброс между минимальным и максимальным значениями *docking score*. Среди 16 структур, содержащих dC в положении N2, 10 структур характеризуются минимальным *docking score* в группах. Такое строение соответствует наличию dG на 3'-конце противоположной цепи, что свидетельствует о предпочтительности связывания Bst экзо- с dG-богатыми ДНК.



**Рис. 15.** Усредненные значения *docking score*, полученные для комплексов Bst экзо- с модельными ДНК при рассмотрении только нуклеотидов N2 и N3 (звездочкой отмечены динуклеотиды, соответствующие наиболее прочным комплексам).

Природа химических взаимодействий, стабилизирующих комплексы, была определена на основании диаграмм взаимодействия лигандов (ДВЛ). Оказалось, что Bst экзо- связывается с модельными ДНК посредством ионных (sb) и водородных (H) связей и слабых взаимодействий (+). В целом, количество аминокислот, образующих связи какого-либо из перечисленных типов, достигает нескольких десятков. Были определены индексы связывания

R по формуле:  $R = sb + N + (+)$ . Оказалось, что для 10 наименее прочных комплексов Bst *exo*- с *dst* значения R не превышали 30 единиц, в то время как для 10 наиболее прочных они были выше этой величины. В наименее прочных структурах повышено содержание dT, а в наиболее прочных – dC в нижней цепи. При этом в *dst* первой из указанных групп в среднем положении триплета заметно чаще находятся dT. В 6 структурах из 10, входящих в группу наиболее стабильных комплексов, верхняя цепь содержит 2 пуриновых нуклеотида (оба 3'-концевые), а в трех присутствует хотя бы один пуриновый нуклеотид. Т.о., прочность связывания Bst *exo*- с ДНК зависит от вида нуклеотидов и для пурин-богатых последовательностей обеспечивает более эффективный запуск побочного ДНК-синтеза.

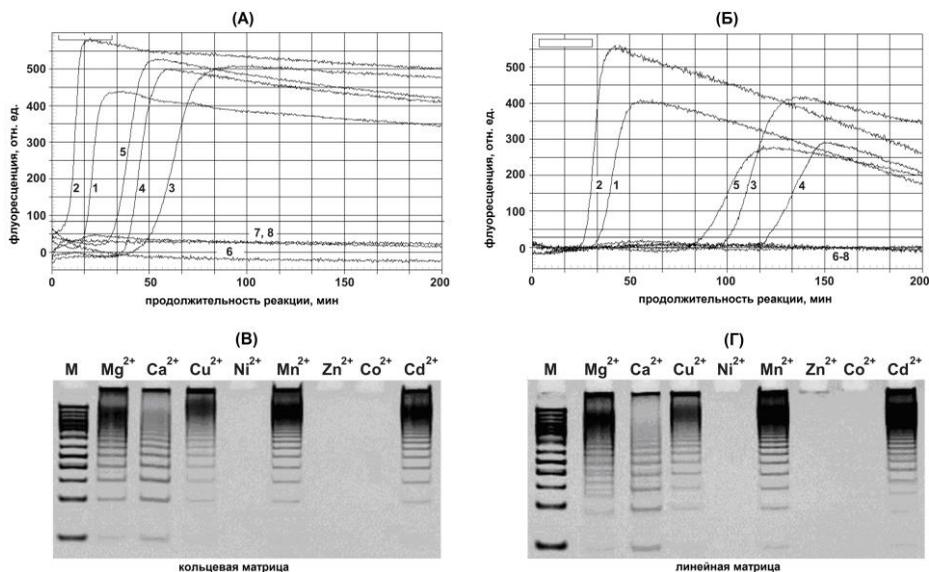
Экспериментальную оценку проводили с использованием ДНК-матриц LTa-LTg длиной 51 нт, различающихся составом концевых мотивов и имеющих идентичную внутреннюю последовательность. Было обнаружено влияние состава 3'-концов ДНК-матриц на величину Tt, позволившее расположить их в следующем порядке: LTg > LTb >> LTa > LTd >> LTf. Полученные результаты коррелируют с данными *in silico* исследований, согласно которым присутствие пуриновых нуклеотидов в качестве 3'-концевых обеспечивает наиболее высокую стабильность комплексов полимеразы с ДНК. Найдено, что хотя "дыхание" цепей ДНК оказывает некоторое влияние на скорость генерации *Ini*, однако в случае сравнимых термодинамических характеристик двуцепочечных структур оно не является определяющим.

#### 4.5. Влияние кофактора на активность полимеразы Bst *exo*-

Поскольку активность ДНК-полимераз зависит от природы кофактора, предположили, что замена  $Mg^{2+}$  другим катионом сможет обеспечить подавление ММ. Было исследовано влияние катионов  $Ca^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  и  $Zn^{2+}$  на протекание ММ под действием ДНК-полимеразы Bst *exo*-. Эксперименты проводили для трех коммерческих продуктов: Bst LF, Bst 2.0 и Bst 3.0. Вместо буферов, поставляемых вместе с полимеразой, были приготовлены пять составов: Thermopol-C, Isothermal-C, Isothermal II-C, Taq-C и Taq-ME-C, полностью идентичных коммерческим, но не содержащих  $Mg^{2+}$ . Соответствующие соли металлов добавляли в реакционные смеси отдельно, обеспечивая стандартную концентрацию катионов (2,5 мМ).

В качестве примера на рисунке 16 приведены результаты амплификации матриц LTc и CTc под действием полимеразы Bst 3.0 в буфере Taq-ME-C; в этом случае АКК и ММ протекали в присутствии пяти катионов:  $Ca^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  и  $Mn^{2+}$ . Рост флуоресцентного сигнала для образцов с КМ происходил на начальных этапах реакции; для образцов с ЛМ значения Tt были значительно больше (рис. 16А и 16Б). Эффект, оказываемый катионами на активность полимеразы Bst 3.0, существенно различался.  $Mn^{2+}$  оказался наилучшим альтернативным кофактором (рис. 16А и 16Б, кривая 2), однако амплификация шла также в присутствии  $Cd^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  и  $Ca^{2+}$  (рис. 16А и 16Б, кривые 3, 4, 5).  $Ni^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  и  $Co^{2+}$  не активировали полимеразу Bst 3.0, т.к. ни

специфическая, ни неспецифическая амплификация не протекали (рис. 16А и 16Б, кривые 6-8). Электрофоретический анализ подтвердил накопление продуктов АКК и ММ (рис. 16В и 16Г).

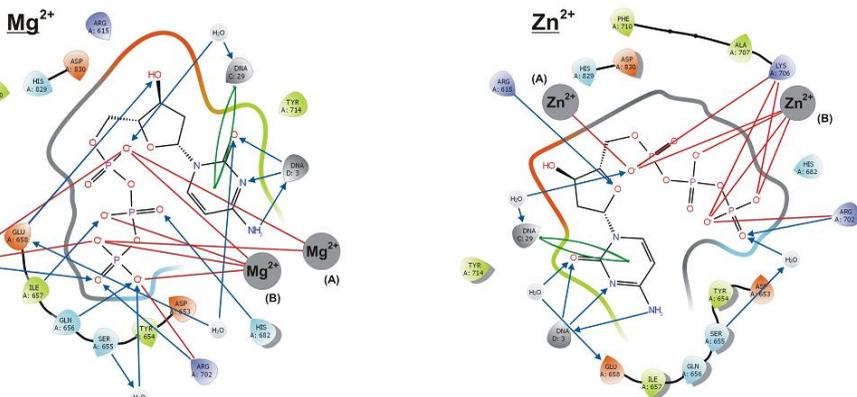


**Рис. 16.** Результаты амплификации кольцевой СТс (А) и линейной ЛТс (Б) матриц под действием Bst 3.0 в буфере Taq-ME-C: кривая 1 –  $Mg^{2+}$ , 2 –  $Mn^{2+}$ , 3 –  $Cd^{2+}$ , 4 –  $Ca^{2+}$ , 5 –  $Ca^{2+}$ , 6-8 –  $Ni^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  и  $Co^{2+}$ . Электрофоретический анализ образцов после амплификации кольцевой (В) и линейной (Г) матриц (10% ПААГ), М – 50 bp DNA ladder.

Дальнейшие эксперименты проводили, добавляя в реакционные смеси пары катионов ( $Mg^{2+}$  и один из альтернативных катионов, взятые в эквимольных концентрациях по 1,25 мМ). Сочетания катионов по-разному влияли на ММ в зависимости от буфера и полимеразы. Синтез ДНК-продуктов стал возможным в присутствии от двух ( $Mg^{2+}/Mn^{2+}$  и  $Mg^{2+}/Ca^{2+}$  для Thermopol-C) до пяти ( $Mg^{2+}/Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}/Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}/Cu^{2+}$ ,  $Mg^{2+}/Ni^{2+}$ ,  $Mg^{2+}/Cd^{2+}$  для буферов Isothermal II-C и Taq-ME-C) ионных пар. Наибольшая специфичность достигались в буфере Taq-ME-C для полимераз Bst LF и Bst 2.0 при активации катионными парами  $Mg^{2+}/Mn^{2+}$  или  $Mg^{2+}/Ca^{2+}$ .

Для оценки влияния ионов на стабильность комплексов "полимераза-ДНК" был проведен докинг четвертичных структур, содержащих полимеразу, ДНК, трифосфат и катионы металлов. Для моделирования были взяты закрытая форма полимеразы Bst  $exo^-$  (1LV5), короткий ДНК-дуплекс, дЦТФ и катионы металлов, в том числе их попарные комбинации. Ионы металлов размещали в позициях А и В фермента. Комплексы визуализировали в виде ДВЛ, позволивших определить тип и количество химических связей между

трифосфатом и активным сайтом фермента. На рисунке 17 приведены ДВЛ для одного из наиболее прочных (два иона  $Mg^{2+}$ , амплификация протекает) и одного из наименее прочных (два иона  $Zn^{2+}$ , амплификация не протекает) комплексов.



**Рис. 17.** Примеры диаграмм взаимодействия лигандов для фермент-субстратных комплексов, для которых изотермическая амплификация протекает (с  $Mg^{2+}$ ) и не протекает (с  $Zn^{2+}$ ): красные линии – солевые мостики, синие стрелки – водородные связи, зеленые дуги –  $\pi$ - $\pi$  взаимодействия.

## 5. Новые способы и приемы НК-анализа

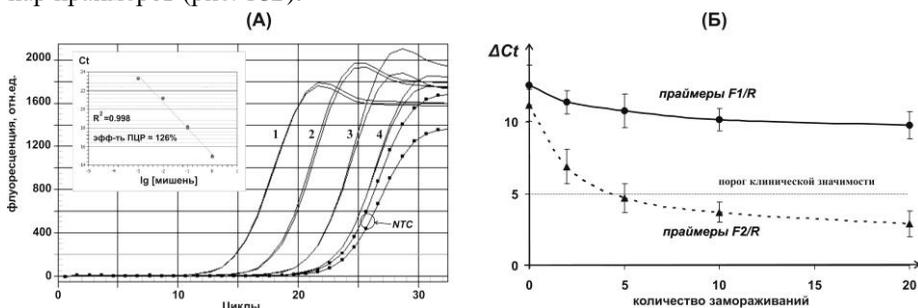
### 5.1. Демонстрация возможностей ПЦР со сближенными праймерами

Демонстрацию возможностей ПЦР-амплификации разрушенных НК с помощью сближенных праймеров провели для ряда объектов (ДНК из древесной трухи и мёда). Поскольку в последние годы глобальным вызовом стал вирус SARS-CoV-2, оценили также возможность обнаружения его РНК в ходе ПЦР со сближенными праймерами. Хотя в подобных случаях непосредственно перед ПЦР проводят реакцию обратной транскрипции (ОТ), представляется удобным проводить анализ с помощью обычной ПЦР (т.е. без этапа ОТ) только с одним ферментом, обладающим активностью как ДНК-зависимой ДНК-полимеразы, так и обратной транскриптазы. Протестировали в качестве единственного фермента ПЦР-смеси несколько ДНК-полимераз Taq; лучший результат был получен с ДНК-полимеразой Немо KlenTaq (НКТ).

Для оценки специфичности и чувствительности детекции РНК готовили модельные образцы смешиванием экстрактов мазков пациентов с подтвержденным диагнозом COVID-19. Были получены образцы Rmix0, Rmix2, Rmix5, Rmix10 и Rmix20, подвергнутые 0-, 2-, 5-, 10- или 20-кратным циклам замораживания-оттаивания, соответственно. Для амплификации брали две пары праймеров: "сближенных" F1/R (ампликон 54 п.о.) и "традиционных" F2/R (123 п.о.). Обнаружена значительная разница во времени начала ЭСР для

взятых праймерных пар, несмотря на одинаковую температуру отжига праймеров и участок амплификации. Так, праймеры F1/R обеспечивали более быструю амплификацию по сравнению с парой F2/R ( $\Delta Ct > 10$  циклов). Сближенные праймеры обеспечили большую эффективность амплификации разрушенной РНК; в то же время для пары F2/R разница значений  $Ct$  для Rmix0 и Rmix20 достигала  $\sim 9$  циклов, что указывает на значительное уменьшение количества амплифицируемых РНК-мишеней. Сравнительные эксперименты показали, что НКТ обеспечивает амплификацию РНК с эффективностью, сравнимой с таковой для ОТ-ПЦР, выполненной с использованием обратной транскриптазы MMLV. Проводили также оценку чувствительности детекции РНК коронавируса SARS-CoV-2. Эксперименты с разведениями образца Rmix0 (10-, 100- и 1000-кратные разведения) показали, что при использовании НКТ и сближенных праймеров достигается обнаружение около  $10^2$ - $10^3$  копий мишени, что свидетельствует о достаточно высокой чувствительности анализа (рис. 18А).

Эксперименты с многократно замороженными образцами РНК в целом показали уменьшение количества амплифицируемых РНК-мишеней для обеих пар праймеров (рис. 18Б).



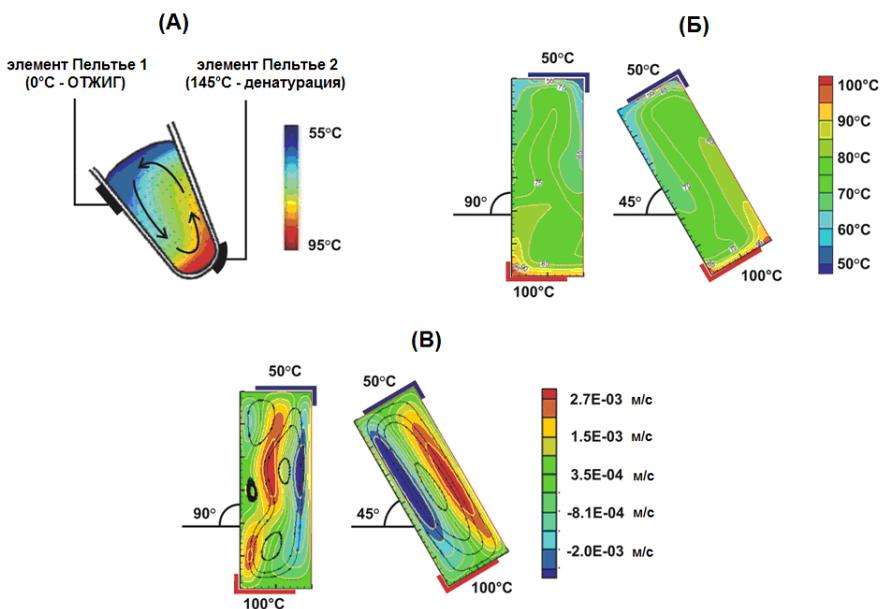
**Рис. 18.** Оценка чувствительности детекции РНК коронавируса SARS-CoV-2 с помощью Нето KlepTaq. (А) Амплификация образца Rmix0: кривые 1 – образец Rmix0 без разведения, 2 – 10-кратное разбавление, 3 – 100-кратное разбавление, 4 – 1000-кратное разбавление. (Б) Влияние многократного замораживания раствора РНК на значения  $Ct$ , полученные для праймеров F1/R (сплошная линия) и праймеров с традиционным расположением F2/R (пунктирная линия). Значения  $\Delta Ct$  определяли следующим образом:  $\Delta Ct = Ct(NTC) - Ct(RmixN)$ , NTC – ОК. Линия при  $\Delta Ct = 5$  соответствует порогу клинической значимости.

Для праймеров "встык" значения  $\Delta Ct$  снижались всего на 2-3 цикла, что соответствует менее чем 10-кратному уменьшению количества мишеней; даже для образца Rmix20  $\Delta Ct$  превышала 5 циклов, что позволяет с высокой достоверностью выявлять специфическую РНК. Для праймеров F2/R снижение значения  $\Delta Ct$  составило  $>5$  циклов даже для образца Rmix5, что указывает на значительное снижение копийности мишени; обнаружение РНК патогена в этом случае можно считать недостаточно надежным. Т.о., сближенные

праймеры обеспечивают эффективное обнаружение разрушенных РНК, что позволяет предъявлять щадящие требования к транспортировке и хранению РНК-материалов, используемых в молекулярной диагностики.

### 5.2. Конвекционная ПЦР

Потребность в экспресс-диагностике обуславливает разработку новых приемов и способов быстрой амплификации НК. Среди таковых можно отметить конвекционную ПЦР (конвПЦР), при проведении которой изменение температуры реакционной смеси обеспечивается за счет перемещения либо всего объема жидкости, либо ее частей в пределах реакционного сосуда. Главной проблемой конвПЦР является необходимость использования особых реакционных сосудов. Нами реализован вариант проведения реакции в стандартных ПЦР-пробирках объемом 0,2 мл. Температура каждой пластины регулировалась элементами Пельтье, а контакт пробирок с пластинами происходил в двух точках площадью около 2 мм<sup>2</sup> каждая (рис. 19А).



**Рис. 19.** Компьютерная симуляция процессов в конвекционной ячейке с наклонным градиентом температур. (А) Схема распределения температуры и движения жидкости в ПЦР-пробирке (черными обозначены зоны отжига (Пельтье 1) и денатурации (Пельтье 2)). (Б) и (Б) Результаты моделирования конвекции. Распределение температуры (Б) и траектории потока (Б) в прямоугольных ячейках, расположенных либо вертикально (90°), либо под углом (45°). Внешние синие и красные элементы обозначают зоны подвода температуры (50°C и 100°C соответственно). Приведены абсолютные значения температуры (°C) и вектора скорости (м/с для вертикальной составляющей вектора скорости).

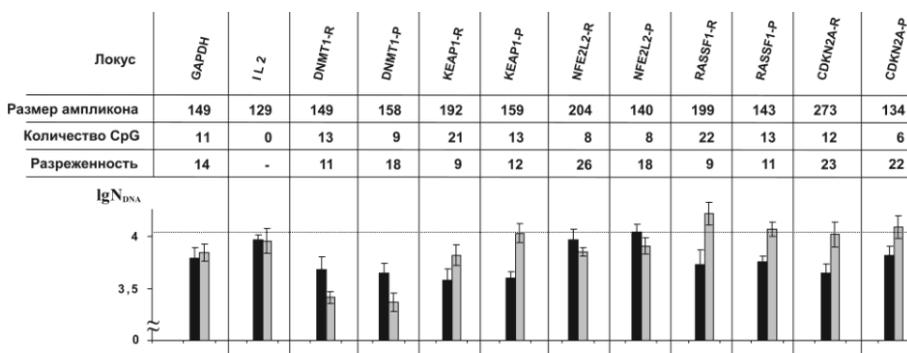
Моделирование тепловых процессов проводилось коллегами из Института механики УФИЦ РАН в двумерном приближении для прямоугольной конвекционной ячейки. Оно показало, что при подаче низкой (50°C) и высокой (100°C) температуры к противоположным углам ячейки поле температуры и движения жидкости принимает эллиптическую форму только в наклонном положении ячейки (рис. 19Б и 19В). Для визуализации движения жидкости в пробирке использовали частицы, полученные сополимеризацией акриламида с производным малахитового зеленого согласно [Vunemann, Muller, 1978]. Обнаружили, что частицы движутся внутри пробирки по замкнутой траектории, аналогичной расчетной, и для 100 мкл жидкости один оборот (предполагаемый цикл конвПЦР) занимает ~2-3 с, т.е. 20-30 циклов ПЦР могут пройти в течение 1-2 мин.

Варьируя объем жидкости, определили, что оптимальный режим температуры устанавливается, когда ее объем обеспечивает высоту столба жидкости примерно в три раза больше диаметра пробирки. Для пробирок объемом 0,2 мл это означает, что их нужно заполнить до одной трети (~70 мкл). Тем не менее, эксперименты показали, что конвПЦР протекает и в больших (до 100 мкл), и в меньших (от 40 мкл) объемах, но эффективность реакции в этих случаях ниже. Поскольку продолжительность одного цикла конвПЦР составляет всего несколько секунд, далее оценили эффективность амплификации фрагментов ДНК разной длины. Использовали праймеры к ДНК пчелы медоносной, обеспечивающие образование ампликонов длиной 38, 55, 75, 99 и 255 п.о. Оказалось, что в конвПЦР успевают синтезироваться в достаточном количестве только короткие ампликоны (до 100 п.о.). Для накопления детектируемого количества ампликонов потребовалось около 15 мин. Поскольку протекание конвПЦР зависит от движения жидкости, предположили, что угол наклона пробирки может оказать существенное влияние на эффективность конвПЦР. Для проверки этого предположения были проведены ПЦР-эксперименты в пробирках, расположенных под углом от 20 до 90° (с шагом 10°) по отношению к горизонту. Наиболее эффективное образование ампликонов наблюдалось в пробирках, наклоненных на 30°.

### 5.3. Метод сравнительной оценки статуса метилирования ДНК

Применимость УЗ-фрагментации ДНК с последующей ПЦР (УФА – Ультразвуковая Фрагментация и Амплификация) для оценки статуса метилирования была показана на примере ДНК человека, выделенной из клеток линии Jurkat и из лейкоцитов здоровых индивидов. Образцы ДНК с концентрацией 30 нг/мкл ( $10^4$  копий мишени) обрабатывали УЗ в течение 2, 8 или 16 мин и использовали далее для кПЦР-амплификации следующих локусов: GAPDH (ген *GAPDH*), IL2 (*IL2*), DNMT1 (*DNMT1*), RASSF1 (*RASSF1*), KEAP1 (*KEAP1*), NFE2L2 (*NFE2L2*) и CDKN2A (*CDKN2A*). Праймеры подбирали к последовательностям вблизи CpG-островков или непосредственно в промоторной области. Для генов *DNMT1*, *KEAP1*, *NFE2L2*,

*RASSF1* и *CDKN2A* было выбрано по два локуса: R-локусы (относительно протяженные и GC-богатые) и P-локусы (относительно короткие и с умеренным GC-составом). Все амплифицированные области содержали CpG, за исключением *IL2*. Поскольку по величине  $N_{DNA}$  нельзя судить об уровне метилирования ДНК, сравнивали тестируемые образцы (ДНК из клеток Jurkat) с контролем (ДНК здоровых индивидов). Такое сравнение указывает только на различия в уровне метилирования CpG. Наиболее показательные результаты были получены для ДНК после 2-минутной УЗ-обработки (рис. 20).



**Рис. 20.** Анализ метилирования промоторных областей ряда генов человека ( $10^4$  копий ДНК-мишени на образец, стандартные условия амплификации). Пунктирная линия соответствует ожидаемому количеству ДНК-мишеней.

Для локуса *GAPDH* наблюдалось некоторое различие в величинах  $N_{DNA}$ , однако оно не было статистически значимым. Для *IL2* различий в  $N_{DNA}$  между Jurkat и контролем также не наблюдалось. Более того, значения  $N_{DNA}$  оказались почти равны количеству ДНК, взятому для эксперимента, что соответствует очень слабой степени фрагментации ДНК. Более высокий уровень метилирования обнаружен для *DNMT1* в Jurkat по сравнению с контролем. Типичное повышение уровня метилирования CpG было найдено также для локусов *RASSF1* и *CDKN2A*. Антагонистический характер метилирования наблюдался для пары *KEAP1-NFE2L2*.

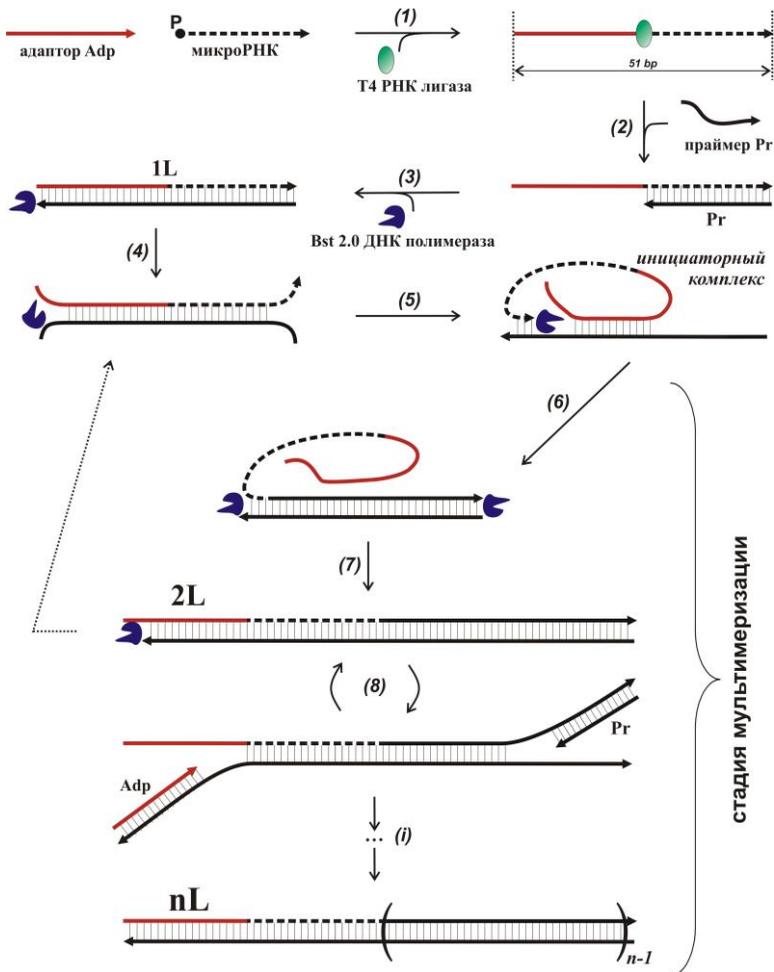
Для верификации полученных данных был определен статус метилирования всех локусов, за исключением *IL2*, методом бисульфитного секвенирования. Для *GAPDH* P не было обнаружено сайтов метилирования, что объясняет результат, полученный и при оценке статуса метилирования с помощью ПЦР. Самый высокий уровень метилирования наблюдался для локуса *DNMT1-P* как для Jurkat, так и для контрольных образцов. Для *KEAP1-P* только четыре специфических сайта (положения CpG-динуклеотидов 4, 6, 7 и 9) были метилированы по-разному наряду с постоянно метилированными (положения 1-3) и постоянно неметилированными (положения 5, 8, 10-13) сайтами. Степень метилирования CpG в локусе *KEAP1-P* была достоверно повышена в ДНК из Jurkat, что коррелировало со снижением  $N_{DNA}$ . Такое же

сайт-специфическое метилирование обнаружено для RASSF1-P (положения CpG 5, 7, 9-12) и CDKN2A-P (положения CpG 2, 4 и 5). Данные секвенирования подтвердили результаты ПЦР-анализа. Т.о., метод УФА может быть использован в тех случаях, когда нет необходимости анализировать метилирование конкретных CpG, например, при оценке воздействия стресса или патологических, возрастных и тканеспецифических изменений.

#### 5.4. Метод оценки уровня микроРНК

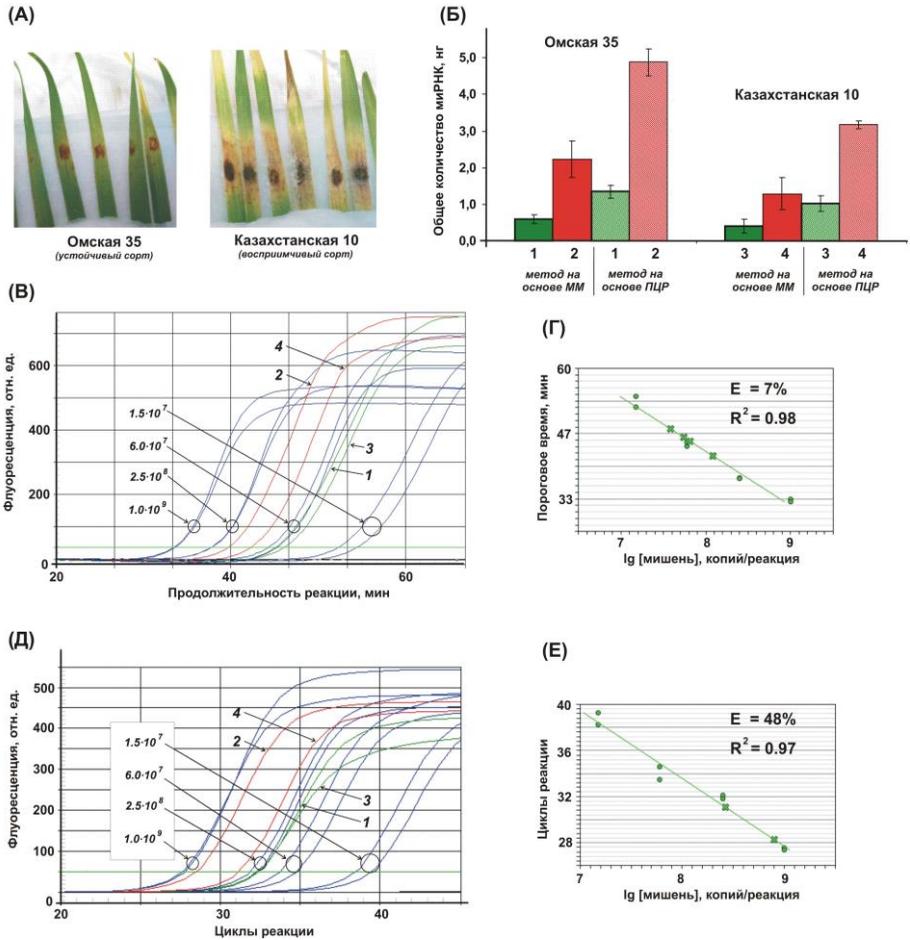
Молекулы миРНК идеально подходят для проведения ММ благодаря малому конечному размеру, что позволяет генерировать НК-структуры, обеспечивающие эффективную ММ. Нами разработан новый подход к обнаружению зрелых миРНК, основанный на ММ (рис. 21). Для повышения скорости и эффективности ММ задавались следующие условия: 1) миРНК и адаптор содержали идентичные олигонуклеотидные мотивы на 3'- и 5'-концах, 2) длина химерного продукта ДНК/РНК составляла 51 нт, 3) реакционные смеси содержали ДНК-полимеразу Bst 2.0, буфер Isothermal (1<sup>\*</sup>), уменьшенное количество SGI и 1 мМ ДТТ. Применимость ММ для обнаружения РНК-мишеней сначала изучали на синтетических миРНК. Для этого синтезировали пять наиболее изученных миРНК растений пшеницы *Triticum aestivum*, а также адаптор Adp и праймер Pr, комплементарный Tae-miR159. Все синтетические миРНК предварительно фосфорилировали, далее лигировали с Adp и проводили ММ. Значения порогового времени Tt, полученные для образцов разного типа, свидетельствовали о высокой специфичности обнаружения миРНК-мишени, поскольку наиболее быстрая амплификация наблюдалась для образцов, содержащих Tae-miR159. Фосфорилирование миРНК немного ускоряло реакцию. Значения Tt для специфической амплификации находились в пределах 30-50 мин, а для образцов контроля составили >80 мин. Электрофоретический анализ показал наличие мультимеров ожидаемой длины только для образцов, содержащих мишень.

Последующие эксперименты проводили с использованием образцов миРНК, выделенных из *T.aestivum*. Для этого брали два сорта мягкой пшеницы с разной устойчивостью к грибной инфекции: Омская 35 (устойчивый к *Septoria nodorum*) и Казахстанская 10 (восприимчивый к *S.nodorum*). У чувствительного сорта наблюдалась явная реакция восприимчивости, которая проявлялась в виде обширных зон поражения, покрывающих до 70% общей площади листа, с типичными пятнами хлороза, некроза и многочисленными пикнидами (рис. 22А). Что касается устойчивого сорта, то поражения состояли из зон некроза, покрывающих лишь 0,5-12% общей площади листа, а мицелий, пикниды или хлороз не обнаруживались. Хотя нативные миРНК содержат 5'-фосфат, миРНК пшеницы дополнительно фосфорилировали, чтобы обеспечить более высокую эффективность ММ.



**Рис. 21.** Схема обнаружения миРНК с помощью мультимеризации (L – длина мономерного звена, (1)-(i) – этапы реакции) (описание в тексте).

Калибровочные образцы, содержавшие  $1,5 \cdot 10^7$ - $1,0 \cdot 10^9$  копий *Tae-miR159*, получали серийными разведениями исходного раствора. Эксперименты позволили определить содержание *Tae-miR159* во всех образцах растений пшеницы (рис. 22В). Было обнаружено примерно 3-кратное увеличение количества *Tae-miR159* для инфицированных растений (рис. 22Б), что свидетельствует об участии этой миРНК в ответ на заражение *S.nodorum*. Значения Tt на калибровочной кривой не демонстрировали той линейной зависимости, которая характерна для кПЦР: дисперсия значений Tt в пределах повторов несколько возрастала с уменьшением числа копий мишени (рис. 22Г).



**Рис. 22.** Результаты количественного определения Taе-miR159. (А) Реакция растений пшеницы сортов Омская 35 (устойчивый) и Казахстанская 10 (чувствительный) на заражение *S.nodorum* (после 6 дней инокуляции). (Б) Общее содержание Taе-miR159 по данным мультимеризации и ПЦР-анализа. (В) Количественная оценка Taе-miR159 с помощью мультимеризации: 1, 2 – Омская 35; 3, 4 – Казахстанская; 1, 3 – контрольные растения (зеленые кривые); 2, 4 – зараженные растения (красные кривые). (Г) Калибровочный график при определении Taе-miR159 с помощью мультимеризации. (Д) Количественная оценка Taе-miR159 с помощью ПЦР: 1, 2 – Омская 35; 3, 4 – Казахстанская; 1, 3 – контрольные растения (зеленые кривые); 2, 4 – зараженные растения (красные кривые). (Е) Калибровочный график при определении Taе-miR159 с помощью ПЦР. Для обеих реакций амплификации калибровочные образцы (синие кривые) содержали синтетическую фосфорилированную Taе-miR159 в количестве  $1,5 \cdot 10^7$ ,  $6,0 \cdot 10^7$ ,  $2,5 \cdot 10^8$ ,  $1,0 \cdot 10^9$  копий/мкл.

Это относительное отклонение от нелинейности объясняется особенностью ММ. Эффективность реакции (E), найденная по формуле  $E = (10 - 1/\alpha - 1) * 100\%$ , где  $\alpha$  – тангенс угла наклона прямой калибровочной зависимости, оказалась низкой, что обусловлено, очевидно, ее особенностями. Тем не менее, ММ позволяет проводить количественную оценку содержания миРНК в пределах привычных диапазонов концентраций, обеспечивая обнаружение около  $10^7$  копий мишени (~20 пМ).

Для верификации полученных данных содержание Тае-miR159 оценивали также методом ПЦР, как описано в [Gupta et al., 2012] (рис. 22Д). Для сравнения находили эффективность реакции по приведенной выше формуле (рис. 22Е). Обнаружено, что метод на основе ПЦР показывает более высокое содержание мишени, что может объясняться в том числе ко-амплификацией ее предшественников (при- и пре-миРНК) (рис. 22Б).

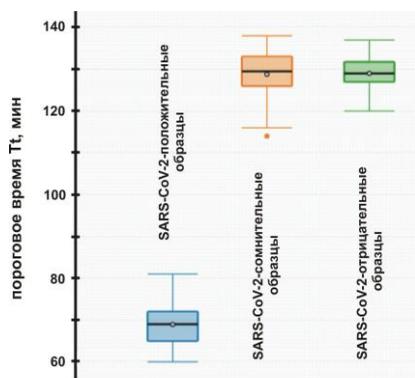
### *5.5. Способ обнаружения вирусных РНК*

Однозначное протекание ММ при определенных условиях позволяет использовать ее для обнаружения любых НК-мишеней. Для демонстрации возможности обнаружения РНК-мишеней с помощью ММ сконструировали две модельные пары праймеров: обычная пара F-S1/R-S1 и праймеры с комплементарными четырехнуклеотидными 5'-концевыми мотивами (F-S2/R-S2). Влияние структуры праймеров на ММ оценивали сначала с использованием синтетической (искусственной) РНК-матрицы Qt, содержащей по три дезоксирибонуклеотида на 5'- и 3'-концах соответственно, что должно обеспечивать более высокую устойчивость этой РНК к расщеплению рибонуклеазами. Праймеры F-S1/R-S1 обеспечили более низкую эффективность ММ (Tt ~70 мин) по сравнению с F-S2/R-S2 (Tt ~50 мин). Оказалось, что ММ протекает быстрее с синтетической РНК по сравнению со сбалансированным образцом Rmix(+).

Применимость ММ для обнаружения специфических РНК изучали на генетическом материале коронавируса SARS-CoV-2. Как и в предыдущих экспериментах, брали сбалансированные препараты Rmix. Было обнаружено, что амплификация протекает для всех образцов: как для SARS-CoV-2-положительных (Rmix(+)), так и для контролей (Rmix(?), Rmix(-) и Rmix(H)). Однако для Rmix(+) значения Tt находились в пределах 60-90 мин от начала реакции, в то время как для остальных превышали 110-120 мин. Для Rmix(+) электрофоретический анализ показал образование характерных ДНК-продуктов с размерами, кратными ожидаемому (~55 п.о.). В остальных образцах также образовались мультимерные продукты, но их размер не соответствовал размеру первичного ампликона, что указывает на протекание "неспецифической" ММ.

Анализ данных, полученных при амплификации индивидуальных образцов, показал возможность дифференциации результатов "специфической" и "неспецифической" ММ. Значения Tt для SARS-CoV-2-положительных образцов находились в пределах 60-80 мин; в то же время для

образцов из остальных групп значения  $T_t$  превышали 115 мин, что свидетельствует об отсутствии в них мишени (рис. 23). Значения  $T_t$  хорошо коррелировали со значениями порогового цикла  $C_t$ , найденными для этих же образцов после ПЦР-тестирования. Диапазоны значений  $T_t$  для SARS-CoV-2-положительных образцов и образцов, не содержавших РНК-мишень, не перекрывались, что позволило различить эти типы образцов и с высокой достоверностью утверждать о выявлении патогенной РНК. Таким образом, значение  $T_t \approx 110$  мин можно считать порогом клинической значимости (для использованных условий реакции).



**Рис. 23.** Распределение значений  $T_t$  для SARS-CoV-2-положительных ( $N = 60$ ), SARS-CoV-2-сомнительных ( $N = 50$ ) и SARS-CoV-2-отрицательных ( $N = 50$ ) образцов (приведены данные для пары праймеров F-S2/R-S2).

Для оценки применимости ММ для анализа разрушенной РНК были приготовлены препараты РНК коронавируса путём многократного замораживания-оттаивания образца Rmix(+). Обнаружено небольшое увеличение значений  $T_t$  с ростом количества циклов замораживания-оттаивания, что свидетельствует о снижении амплифицируемых РНК-мишеней. Неожиданно, но для Rmix, подвергнутого двукратному замораживанию, наблюдалось незначительное снижение  $T_t$ , что, вероятно, связано с увеличением эффективности ММ за счёт образования более коротких РНК. Увеличение количества циклов замораживания-оттаивания приводило к постепенному увеличению  $T_t$ , но даже для образца Rmix20  $T_t$  не превысило 110 мин, что позволило с высокой достоверностью выявить целевую РНК. Т.о., сближение праймеров позволяет обнаруживать разрушенную РНК и предъявлять менее строгие требования к транспортировке и хранению РНК-содержащих материалов. Разработанный способ требует использования одного фермента – ДНК-полимеразы, обладающей активностями обратной транскриптазы и ДНК-зависимой ДНК-полимеразы, а также цепь-вытесняющей активностью. Предлагаемый способ позволяет обнаруживать РНК даже в образцах, подвергшихся замораживанию. Его можно использовать дополнительно или как альтернативу известным методам в тех случаях, когда последние не обеспечивают получение надежного результата.

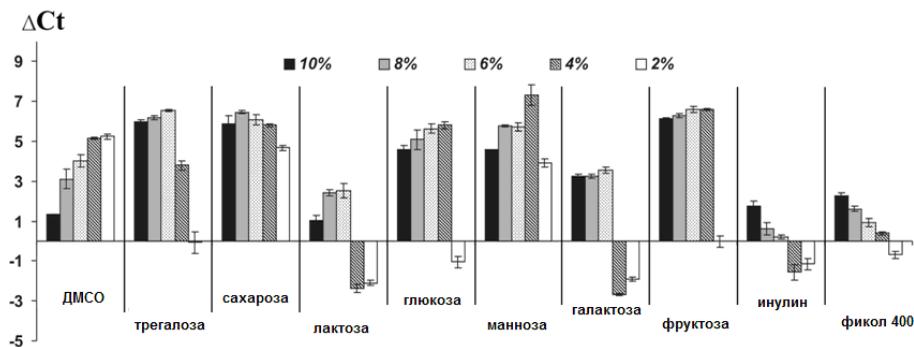
## **6. Повышение эффективности и специфичности амплификации НК**

### **6.1. Повышение эффективности ПЦР с помощью углеводов**

Известно, что эффективность ПЦР зависит от множества факторов, таких как качество ДНК, длина и GC-состав амплифицируемого участка, присутствие ингибиторов ПЦР и т.д. Для преодоления трудностей, возникающих в ходе амплификации, в реакционные смеси часто добавляют низкомолекулярные органические соединения – ПЦР-энхансеры, такие как ДМСО, бетаин, тетраалкиламмониевые соли и др. Нами на примере было ДНК-мишеней разной длины и GC-состава изучено влияние углеводов (сахароза, лактоза, глюкоза, фруктоза, галактоза, манноза, инулин и фиколл 400) на протекание ПЦР. Для амплификации отобрали восемь мишеней. Из них три мишени – нуклеотидные последовательности MR-S (относительно короткая, 352 пн), MR-M (средняя, 525 пн) и MR-L (относительно длинная, 1029 пн) из генома богомола обыкновенного (ген *28S rRNA*), еще три мишени (phL-S, 342 bp; phL-L, 1019 bp; phL-XL, 3063 bp) – из генома фага  $\lambda$ , и две мишени – из генома человека (H-S и H-L). Данные мишени были представлены высококопийными (MR-S, MR-M и MR-L) и уникальными нуклеотидными последовательностями (H-S и H-L). ДНК  $\lambda$  была выбрана из-за относительно равномерного распределения нуклеотидов dG и dC в пределах амплифицируемых областей; их GC-состав варьировал от 53,8 до 73,9%. Для проведения ПЦР брали праймеры, использованные при выполнении других исследований, а также подобранные дополнительно. Сначала оценивали эффективность амплификации GC-богатого фрагмента ДНК длиной 525 пн (участок MR-M) в отсутствие углеводов с использованием ДНК-полимераз, различающихся точностью и процессивностью: AmpliTaq Gold, Phire, Phusion U, Phusion HF и Taq. ПЦР проводили в присутствии и отсутствии интеркалирующих красителей (Taq + SYBR Green I, Taq + EvaGreen), но с детекцией по конечной точке. Все полимеразы, кроме сочетания Taq + SYBR Green I, обеспечили наработку специфического продукта, но его выход существенно различался. ПЦР с полимеразой Taq в присутствии SYBR Green I не протекала, вероятно, из-за ингибирования красителем. Далее проводили амплификацию локусов phL-S, phL-L и phL-XL в присутствии 10% сахарозы с использованием ДНК-полимеразы Phusion U, предназначенной для синтеза длинных ампликонов (до 20 кб). Обнаружено, что сахароза в большей степени повышает выход продуктов амплификации для более коротких последовательностей по сравнению с протяженными.

Далее проводили ПЦР-амплификацию для всех вышеупомянутых участков в присутствии углеводов с использованием готового ПЦР-микса с интеркалирующим красителем EvaGreen. Таким образом, в экспериментах задавали три фактора, которые существенно снижают эффективность ПЦР: увеличенный размер области амплификации (до 3063 п.о.), высокий GC-состав мишеней (до 73,9%) и наличие интеркалирующего красителя. Влияние углеводов оценивали по значениям  $\Delta C_t$ , полученным для образцов с

содержанием ПЦР-энхансеров в количестве 2, 4, 6, 8 или 10% масс. Значения  $\Delta Ct$  определяли как разницу между значениями  $Ct$  исследуемых образцов (X% добавок) и положительного контроля (0% добавок). В целом, ПЦР ускорялась в присутствии большинства сахаридов. Максимальные значения  $\Delta Ct$  получены для образцов, содержащих сахарозу или маннозу, или 6-10% трегалозы, или 4-10% глюкозы, или 4-10% фруктозы (рис. 24, показано на примере MR-M).



**Рис. 24.** Влияние углеводов на протекание ПЦР (на примере участка MR-M, стандартные условия ПЦР, использован ПЦР-микс с красителем EvaGreen).

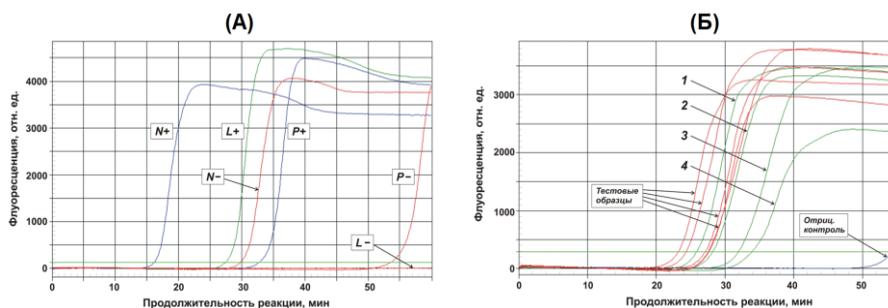
Высокие концентрации лактозы, галактозы, инулина и фикола 400 способствовали повышению эффективности ПЦР, однако низкое их содержание приводило к увеличению значений  $Ct$  по сравнению с контролем. Наилучший результат получен для сахарозы, которая обеспечивала повышение эффективности ПЦР при всех взятых концентрациях.

### 6.2. Повышение специфичности LAMP

Считается, что петлевая изотермическая амплификация (LAMP) обеспечивает более высокую специфичность обнаружения мишеней за счет увеличения количества сайтов отжига праймеров на матрице. Однако известно, что чем больше праймеров участвует в реакции, тем выше вероятность образования нежелательных вторичных структур, приводящих к неспецифическим ампликонам. Дизайн LAMP-праймеров нужно осуществлять с особой тщательностью, предъявляя более строгие требования к их подбору. Совместно с коллегами из Института нефтехимии и катализа УФИЦ РАН были разработаны алгоритм и новая компьютерная программа для конструирования LAMP-праймеров, названная LAMPprimers iQ. В их основе лежат следующие особенности: 1) возможность подбора праймеров с максимально допустимым сближением, 2) возможность подбора праймеров на основе протяженных нуклеотидных последовательностей (верхний предел не ограничен), 3) исключение праймеров, способных образовывать гомо- и гетеродимеры (учитывается перекрывание двух и более 3'-концевых нуклеотидов). Близкое расположение праймеров позволяет уменьшить размер

амплифицируемой области вплоть до 150 п.о. по сравнению с >200 п.о. для обычной LAMP. Программа LAMPprimers iQ имеет простой и интуитивно понятный англоязычный интерфейс.

Экспериментальную оценку праймеров, сконструированных с помощью LAMPprimers iQ, проводили с использованием генетического материала коронавируса SARS-CoV-2. Праймеры подбирали к короткой нуклеотидной последовательности (часть гена *S* размером 1000 п.о.) с помощью LAMPprimers iQ, а также альтернативных программ NEB LAMP Primer Design и PrimerExplorer (наборы L, N и P соответственно). Хотя для выбора праймеров были заданы одни и те же параметры, LAMPprimers iQ генерировала более длинные праймеры по сравнению с остальными программами. Сравнительный LAMP-анализ проводили для всех трех комплектов праймеров (наборы L, N и P) в идентичных условиях (в едином эксперименте). Обнаружено, что праймеры, сгенерированные NEB LAMP Primer Design, обеспечивали наиболее ранний старт ЭСР, однако приводили также и к раннему накоплению неспецифических продуктов (рис. 25А).



**Рис. 25.** Кривые амплификации, полученные при выявлении генетического материала коронавируса SARS-CoV-2. (А) Подписи L, N и P соответствуют наборам праймеров, выбранным с помощью: L – LAMPprimers iQ, N – NEB LAMP Primer Design и P – PrimerExplorer, соответственно; "+" образцы содержали РНК коронавируса SARS-CoV-2, "-" контроль (использовался один и тот же образец Rmix(-) для всех наборов праймеров). (Б) Кривые амплификации, полученные с использованием праймеров набора L: 1-4 – кривые, соответствующие последовательным разбавлениям образца Rmix(+) (выделены зеленым цветом: 1 – без разбавления, 2 – разбавление в 10 раз, 3 – в 100 раз, 4 – в 1000 раз). Тестовые образцы – образцы, содержавшие индивидуальные лизаты носоглоточных мазков больных COVID-19 (выделены красным цветом), отрицательный контроль – образец, не содержавший НК (выделен синим цветом).

Праймеры, сгенерированные программой LAMPprimers iQ, обеспечили более поздний подъем кривых амплификации для тестовых образцов по сравнению с праймерами N. Но, в отличие от последних, они не приводили к неспецифической амплификации и позволили получить надежные результаты. Образцы с праймерами, сконструированными PrimerExplorer, показали самый

поздний подъем кривых для тестовых образцов и ОК. Применимость праймеров, подобранных LAMPprimers iQ, для выявления РНК была верифицирована на выборке образцов, полученных от больных с диагнозом COVID-19 и от пациентов с подозрением на COVID-19 (рис. 25Б). Значения Tt хорошо коррелировали со значениями порогового цикла Ct, найденными для этих же образцов после ПЦР-тестирования. Диапазоны значений Tt для SARS-CoV-2-положительных образцов и образцов, не содержащих мишень, не перекрывались, что позволило их дифференцировать и с высокой достоверностью выявлять патогенную РНК.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Развитие методов амплификации НК в контексте их использования для обнаружения НК-мишеней определяется типом и состоянием анализируемой НК и включает решение вопросов, связанных с обеспечением высокой специфичности и чувствительности анализа. Однако амплификационно-опосредованный анализ кцНК до сих пор остается трудоемким, требует соблюдения особых условий и высокой квалификации персонала. В препаратах разрушенных НК содержатся молекулы разной длины, и только часть из них способны служить матрицами для ДНК-синтеза. Подбор оптимальных нуклеотидных последовательностей мишеней для таких НК затруднен. Наиболее очевидным решением здесь является использование сближенных праймеров, однако оно требует приложения определенных усилий для предотвращения неспецифического ДНК-синтеза, поскольку небольшие молекулы НК, к которым можно отнести не только исследуемые кцНК, но также праймеры и продукты их димеризации, обладают праймероподобными свойствами. Таким образом, достижение высокой чувствительности при обнаружении коротких НК-мишеней – крайне сложная задача. В связи с этим основное внимание в данной работе было уделено изучению отдельных свойств ключевых компонентов амплификационных систем с точки зрения обеспечения более высокой чувствительности и специфичности амплификации НК-мишеней в препаратах кцНК и поиску новых подходов к их анализу.

Первая часть работы была посвящена изучению контекстно-зависимых свойств ДНК, неспецифической активности цепь-вытесняющих ДНК-полимераз и особенностей протекания ПЦР-амплификации со сближенными праймерами. Во второй части отражены результаты поиска новых подходов и преимущества их применения при анализе "сложных" НК-мишеней. Полученные результаты способствуют более глубокому пониманию процессов, происходящих при фрагментации молекул НК и связанных с протеканием неспецифического ДНК-синтеза при амплификации разрушенных НК. Данные о влиянии нуклеотидного контекста на разрушение ДНК по определенным сайтам должны учитываться в тех случаях, когда предполагается нахождение НК во фрагментированном состоянии. Данные о

способности цепь-вытесняющих ДНК-полимераз вызывать мультимеризацию позволят разработать подходы, обеспечивающие большую достоверность изотермической амплификации. Полученные данные могут применяться как в научных исследованиях, так и на практике при постановке амплификационных экспериментов, начиная с подбора нуклеотидных последовательностей мишеней и праймеров и заканчивая интерпретацией результатов.

## ВЫВОДЫ

1. Характер механической фрагментации дцДНК зависит от нуклеотидного контекста. С наибольшей скоростью под действием ультразвука расщепляются ДНК-последовательности с равномерным распределением и средней плотностью 5'-CG-3' (в среднем один 5'-CG-3' на 14-15 п.о. цепи). На модели ДНК-ампликонов показано, что скорость ультразвукового расщепления небольших (~100-1000 п.о.) дцДНК положительно коррелирует с увеличением их длины и повышением ионной силы раствора; дцДНК размером менее одной персистентной длины (~150-160 п.о.) практически не фрагментируются.
2. Метилирование цитозина повышает частоту расщепления дцДНК по CpG-сайтам под действием ультразвука. По данным гель-электрофоретического анализа, максимальное различие в степени фрагментации метилированной и неметилированной ДНК проявляется после 15-20-минутного облучения ультразвуком мощностью 320 Вт; по данным ПЦР-анализа, наибольшее различие в количестве амплифицируемых ДНК-мишеней достигается после кратковременного (до 5 мин) облучения. Кратковременная обработка дцДНК ультразвуком обеспечивает возможность проведения сравнительной оценки статуса метилирования исследуемых локусов с помощью ПЦР в реальном времени.
3. Использование в ПЦР максимально сближенных праймеров (праймеров, расположенных "встык") позволяет снизить продолжительность реакции примерно в 3 раза за счет сокращения длительности этапов денатурации, отжига и элонгации и снижения температуры денатурации до ~80°C с сохранением высокой эффективности реакции. ПЦР с праймерами "встык" характеризуется более высокими специфичностью и чувствительностью, менее чувствительна к действию ингибирующих агентов, способна обеспечить диагностически значимое обнаружение РНК-мишеней с помощью ДНК-полимеразы Taq и амплификацию разрушенной ДНК в условиях, при которых использование праймеров с традиционным расположением не приводит к удовлетворительному результату.
4. При конструировании праймеров, особенно расположенных "встык", недопустима комплементарность их двух и более 3'-концевых нуклеотидов. "Качественные" праймеры "встык" способны обеспечить абсолютную специфичность и высокую чувствительность ПЦР с пределом обнаружения вплоть до единичных копий мишени. Для праймеров,

образующих гомо- и/или гетеродимерные структуры, накопление продуктов димеризации в ходе амплификации ускоряется в присутствии любой ДНК, и его практически невозможно предотвратить даже с помощью "горячего старта".

5. Цепь-вытесняющие ДНК-полимеразы с умеренной или высокой термостабильностью приводят к мультимеризации ДНК в условиях, способствующих "дыханию" цепей. Мультимеризация начинается с образования псевдоциклической ДНК-структуры за счет изгиба свободных 3'-концов цепей ДНК-дуплекса и их отжига на противоположной цепи. Она ингибируется в условиях, препятствующих образованию или элонгации псевдоциклической ДНК.
6. Согласно данным молекулярного докинга, ДНК-полимераза Bst образует чуть более прочные комплексы с пурин-богатыми нуклеотидными последовательностями, что подтверждается более ранним началом мультимеризации для ДНК-матриц, содержащих олигопуриновые концевые мотивы. При определенных условиях она обеспечивает амплификацию ДНК в присутствии не только ионов  $Mg^{2+}$  и  $Mn^{2+}$ , но также  $Ca^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  и  $Cu^{2+}$ . Наиболее предпочтительным альтернативным кофактором является  $Mn^{2+}$ , который в сочетании с  $Mg^{2+}$  ингибирует протекание мультимеризации.
7. Благодаря однозначности протекания мультимеризации при определенных условиях становится возможным применение данной реакции для анализа НК-мишеней. Предложен новый способ оценки уровня специфических мРНК, основанный на мультимеризации, не требующий проведения этапа обратной транскрипции и использования флуорогенных зондов. В реакцию вовлекаются только зрелые микроРНК. Предложен способ обнаружения вирусных РНК, обеспечивающий детекцию генетического материала даже в препаратах, подвергнувшихся многократному замораживанию.
8. РНК-лигаза T4 в присутствии 5-10% полиэтиленгликоля 4000 способна обеспечить образование небольших одноцепочечных кольцевых ДНК-матриц из разрушенной ультразвуком дцДНК в количестве, достаточном для их уверенной амплификации "катящимся кольцом". Возможно типирование микродиплотипов с помощью подхода, основанного на циклизации специальной С-пробы, последующей амплификации "катящимся кольцом" и секвенировании продуктов реакции.
9. При использовании для проведения петлевой изотермической амплификации (LAMP) праймеров с близким расположением и не образующих гомо- и/или гетеродимерные структуры, достигается высокая реакционная специфичность реакции. Разработана компьютерная программа LAMPprimers iQ, позволяющая, в отличие от альтернативных программных средств, использовать протяженные нуклеотидные последовательности и задавать жесткие критерии при подборе LAMP-праймеров.

## Основные результаты диссертации изложены в следующих работах

*Статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus:*

1. **Гарафутдинов Р.Р.**, Галимова А.А., Сахабутдинова А.Р., Вахитов В.А., Чемерис А.В. ПЦР-амплификация ДНК с помощью праймеров «встык» // Молек. биология. 2015. т. 49. № 4. с. 628-637.
2. **Гарафутдинов Р.Р.**, Галимова А.А., Сахабутдинова А.Р., Чемерис А.В. ПЦР-анализ специфичной к последовательности ультразвуковой фрагментации ДНК // Молек. биология. 2016. т. 50. № 2. с. 272-278.
3. **Garafutdinov R.R.**, Galimova A.A., Sakhabutdinova A.R. Polymerase chain reaction with nearby primers // Anal. Biochem. 2017. V. 518. P. 126-133.
4. Сахабутдинова А.Р., Максимова М.А., **Гарафутдинов Р.Р.** Получение кольцевых одноцепочечных ДНК-матриц с помощью T4 РНК лигазы для амплификации по типу катящегося кольца // Молек. биология. 2017. т. 51. № 4. с. 724-733.
5. **Garafutdinov R.R.**, Galimova A.A., Sakhabutdinova A.R. The influence of CpG (5'-d(CpG)-3' dinucleotides) methylation on ultrasonic DNA // J. Biomol. Struct. Dynamics. 2019. V. 37. P. 3877-3886.
6. **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.
7. **Garafutdinov R.R.**, Sakhabutdinova A., Kupryushkin M., Pyshnyi D.V. Prevention of DNA multimerization during isothermal amplification with Bst DNA polymerase // Biochimie. 2020. V. 168. P. 259-267.
8. **Garafutdinov R.R.**, Galimova A.A., Sakhabutdinova A.R. The influence of quality of primers on the formation of primer dimers in PCR // Nucleos. Nucleot. Nucleic acids. 2020. V. 39(9). P. 1251-1269.
9. **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.
10. **Garafutdinov R.R.**, Sakhabutdinova A.R., Kupryushkin M.S., Pyshnyi D.V. Data on multimerization efficiency for short linear DNA templates and phosphoryl guanidine primers during isothermal amplification with Bst exo- DNA polymerase // Data-in-Brief. 2020. V. 29. 105188.
11. Sakhabutdinova A.R., Chemeris A.V., **Garafutdinov R.R.** Enhancement of PCR efficiency using mono- and disaccharides // Anal. Biochem. 2020. V. 606. 113858.
12. **Garafutdinov R.R.**, Kupova O.Y., 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.
13. **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.

14. Sakhabutdinova A.R., Kamalov M.I., Mavzyutov A.R., **Garafutdinov R.R.** Inhibition of nonspecific polymerase activity using poly(aspartic) acid as an anionic polyelectrolyte // Anal. Biochem. 2021. V. 628. 114267.
15. **Garafutdinov R.R.**, Chemeris D.A., Sakhabutdinova A.R., Moiseev K.V., Privalov L.Yu., Chemeris A.V. Convective polymerase chain reaction in standard microtubes // Anal. Biochem. 2022. V. 641. 114565.
16. Sakhabutdinova A.R., Gazizov R.R., Chemeris A.V., **Garafutdinov R.R.** Reverse transcriptase-free detection of viral RNA using Hemo KlenTaq DNA polymerase // Anal. Biochem. 2022. V. 659. 114960.
17. **Гарафутдинов Р.Р.**, Сахабутдинова А.Р., Аминев Ф.Г., Чемерис А.В. Новый полиморфный ДНК-маркер для определения пола человека по его биологическому материалу // Суд.-мед. эксп. 2022. т. 65. №4. с. 36-40.
18. Ахметзянова Л.У., Давлеткулов Т.М., **Гарафутдинов Р.Р.**, Губайдуллин И.М. Применение алгоритма Ахо-Корасик для подбора праймеров для петлевой изотермической амплификации // Мат. биол. биоинформ. 2022. т. 17. № 2. с. 250-265.
19. **Garafutdinov R.R.**, Burkhanova G.F., Maksimov I.V., Sakhabutdinova A.R. New method for microRNA detection based on multimerization // Anal. Biochem. 2023. V. 664. 115049.
20. Сахабутдинова А.Р., Чемерис А.В., **Гарафутдинов Р.Р.** Обнаружение специфических РНК мишеней с помощью мультимеризации // Биохимия. 2023. т. 88. №5. с. 832-840.
21. Akhmetzianova L.U., Davletkulov T.M., Sakhabutdinova A.R., Chemeris A.V., Gubaydullin I.M., **Garafutdinov R.R.** LAMPprimers iQ: New primer design software for loop-mediated isothermal amplification (LAMP) // Anal. Biochem. 2024. V. 684. 115376.
22. **Гарафутдинов Р.Р.**, Купова О.Ю., Сахабутдинова А.Р. Влияние нуклеотидного контекста на протекание неспецифической амплификации ДНК под действием ДНК-полимеразы Bst exo- // Биохимия. 2024. т. 89. №1. с. 53-64.

#### *Патенты*

1. Чемерис Д.А., Чемерис А.В., Магданов Э.Г., **Гарафутдинов Р.Р.**, Гареев А.Р., Шальков П.А. Конвекционный ДНК термоциклер // Патент на полезную модель РФ №0079672 от 03.04.2008.
2. Чемерис Д.А., Чемерис А.В., Магданов Э.Г., **Гарафутдинов Р.Р.**, Вахитов В.А., Урманчиев С.Ф., Лебедев Ю.А. Способ проведения полимеразной цепной реакции с помощью конвекции // Патент на изобретение РФ № 2413770 от 10.03.2011.
3. Ахметзянова Л.У., Давлеткулов Т.М., **Гарафутдинов Р.Р.**, Чемерис А.В., Губайдуллин И.М. LAMPprimers iQ // Свид-во о регистрации программы для ЭВМ №2022617417 от 20.04.2022.
4. Ахметзянова Л.У., Давлеткулов Т.М., Хайритдинов В.Д., **Гарафутдинов Р.Р.**, Губайдуллин И.М. Дизайн праймеров для петлевой изотермической реакции (LAMP PRIMERS iQ\_loop) // Свид-во о регистрации программы для ЭВМ №2023662840 от 14.06.2023.

