МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ИНСТИТУТ БИОХИМИИ И ГЕНЕТИКИ УФИМСКОГО ФЕДЕРАЛЬНОГО ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ЦЕНТРА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

Гарафутдинов Равиль Ринатович

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ НОВЫХ АМПЛИФИКАЦИОННО-ОПОСРЕДОВАННЫХ МЕТОДОВ АНАЛИЗА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени доктора химических наук

1.5.4 — биохимия (химические науки)

Научный консультант: доктор биологических наук, профессор А.В. Чемерис

оглавление

	стр.
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	8
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	16
1.1. Амплификация нуклеиновых кислот	17
1.1.1. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)	17
1.1.2. Петлевая изотермическая амплификация (LAMP)	21
1.1.3. Амплификация "катящимся кольцом" (АКК)	28
1.2. Особенности ключевых компонентов амплификационных систем	38
1.2.1. Фрагментация нуклеиновых кислот	38
1.2.1.1. Разрушение ДНК в естественных условиях	39
1.2.1.2. Искусственная фрагментация ДНК	41
1.2.1.3. Свойства молекул ДНК, влияющие на фрагментацию	43
1.2.2. Неспецифическая активность ДНК-полимераз	44
1.2.3. Требования к дизайну праймеров	47
1.3. Некоторые проблемные аспекты амплификационного анализа	53
1.3.1. Выделение короткоцепочечных НК	53
1.3.2. Сложности при работе с короткоцепочечными НК	55
1.3.3. Проблема неспецифической амплификации НК	58
1.3.4. Ингибиторы и энхансеры амплификации	60
1.4. Заключение	63
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	65
2.1. Реактивы и материалы	65
2.2. Олигонуклеотиды, использованные в работе	66
2.3. Выделение НК	89
2.4. Подготовка препаратов НК	93
2.5. Амплификация НК	96
2.5.1. Амплификация в режиме термоциклирования	97
2.5.2. Изотермическая амплификация	98
2.6. Гель-электрофорез	100
2.7. Секвенирование ДНК	101

2.8. Молекулярное моделирование и докинг	101
2.9. Базы данных и программное обеспечение	102
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	
3.1. Фрагментация ДНК ультразвуком	103
3.1.1. Влияние длины молекул на фрагментацию ДНК	106
3.1.2. Оценка сиквенс-специфичности фрагментации ДНК	109
3.1.3. Влияние метилирования CpG на фрагментацию ДНК	115
3.2. ПЦР-амплификация с использованием сближенных праймеров	118
3.2.1. Особенности протекания ПЦР со сближенными праймерами	118
3.2.2. Оценка чувствительности ПЦР с праймерами "встык"	125
3.2.3. Влияние ингибиторов на ПЦР со сближенными праймерами	127
3.3. Димеризация праймеров в условиях ПЦР	130
3.3.1. Влияние структуры праймеров на эффективность димеризации	130
3.3.2. Влияние матрицы на димеризацию праймеров	135
3.4. Неспецифическая изотермическая амплификация (мультимеризация)	139
3.4.1. Условия, способствующие мультимеризации ДНК	139
3.4.2. Механизм мультимеризации ДНК	149
3.4.3. Способы предотвращения мультимеризации	163
3.4.4. Предпочтительность связывания Bst exo- с ДНК	166
3.4.5. Влияние кофактора на активность полимеразы Bst exo	179
3.5. Новые способы и приемы НК-анализа	189
3.5.1. Демонстрация возможностей ПЦР со сближенными праймерами	189
3.5.1.1. Обнаружение ДНК-мишеней в разрушенных биоматериалах.	189
3.5.1.2. Обнаружение разрушенных РНК	195
3.5.1.3. Конвекционная ПЦР	199
3.5.1.4. Определение половой принадлежности биоматериалов	
человека	205
3.5.2. Метод сравнительной оценки статуса метилирования ДНК	208
3.5.3. Способ циклизации одноцепочечных ДНК	212
3.5.4. Способ типирования микродиплотипов	217
3.5.5. Обнаружение НК-мишеней с помощью мультимеризации	220
3.5.5.1. Метод оценки уровня микроРНК	220

3.5.5.2. Способ обнаружения вирусных РНК	225
3.6. Повышение эффективности и специфичности амплификации НК	232
3.6.1. Повышение эффективности ПЦР с помощью углеводов	232
3.6.2. Повышение специфичности LAMP	237
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	245
ВЫВОДЫ	249
СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	251
ПРИЛОЖЕНИЕ. Дополнительные материалы и некоторые	
экспериментальные данные	304

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

2-ME	2-меркаптоэтанол		
BIP	Backward Inner Primer, внутренний обратный праймер (в LAMP)		
CGI	СрG-островки		
CPG	controlled pore glass, стекло с контролируемой пористостью		
CpG	динуклеотиды 5'-d(CpG)-3' (5'-CG-3')		
CpN	динуклеотиды 5'-d(CpN)-3' (5'-CN-3')		
Cq	threshold cycle, пороговый цикл (при количественной оценке)		
Ct	threshold cycle, пороговый цикл (без количественной оценки)		
FIP	Forward Inner Primer, прямой внутренний праймер (в LAMP)		
FRET	free resonance energy transfer, резонансный перенос энергии		
	флуоресценции		
НКТ	ДНК-полимераза Hemo KlenTaq		
HRM	high resolution melting, плавление с высоким разрешением		
Ini	инициаторный комплекс (в мультимеризации), псевдоциклическая ДНК-		
	структура		
LAMP	Loop-mediated isothermal AMPlification, петлевая изотермическая		
	амплификация		
LNA	locked nucleic acids		
LoD	limit of detection, предел чувствительности/обнаружения		
MST	Methyl Screen Technology, технология Methyl Screen		
NCBI	National Center for Biotechnology Information, Национальный центр		
	биотехнологической информации		
NEB	New England Biolabs		
N _{DNA}	количество амплифицируемых НК-мишеней		
NGS	next generation sequencing, секвенирование следующего поколения		
NTC/NC	отрицательный (безматричный) контроль		
PDB	protein data base, база данных белков		
PNA	peptide nucleic acids, пептидно-нуклеиновые кислоты		
POCT	point-of-care testing, анализ по месту лечения		
Pu	пуриновые основания/нуклеотиды		
Ру	пиримидиновые основания/нуклеотиды		
RCA	rolling circle amplification, амплификация "катящимся кольцом"		

RT-LAMP	обратно-транскрипционная петлевая изотермическая амплификация		
SE	СибЭнзим		
SNP	single nucleotide polymorphism, однонуклеотидный полиморфизм		
STR	short tandem repeats, короткие тандемные повторы		
Ta	температура отжига		
TAE	трис-ацетатный буфер		
TBE	трис-боратный буфер		
TEMED	N,N,N',N'-тетраэтилметилендиамин		
TFS	Thermo Fisher Scientific		
T _m	температура плавления		
Tt	threshold time, пороговое время		
а/к	аминокислоты		
АКК	амплификация "катящимся кольцом"		
АС-ПЦР	аллель-специфическая полимеразная цепная реакция		
ATΦ	аденозинтрифосфат		
БД	база данных		
БСА	бычий сывороточный альбумин		
вкДНК	внеклеточная ДНК		
ВЭЖХ	высокоэффективная жидкостная хроматография		
ДВЛ	диаграмма взаимодействия лигандов		
дДНК	древняя ДНК		
ддНТФ	дидезоксинуклеозидтрифосфат		
ДДС	додецилсульфат натрия		
ДМСО	диметилсульфоксид		
дНТФ	дезоксирибонуклеозидтрифосфаты		
ДТТ	дитиотрейтол		
дцДНК	двуцепочечная ДНК		
КМ	кольцевая матрица		
кПЦР	количественная ПЦР		
конвПЦР	конвекционная ПЦР		
кцДНК	короткоцепочечная ДНК		
кцНК	короткоцепочечные нуклеиновые кислоты		
ЛМ	линейная матрица		
метДНК	метилированная ДНК		
миРНК	микроРНК		

MM	мультимеризация
неметДНК	неметилированная ДНК
НК	нуклеиновая кислота
HT	нуклеотид
НЧЗ	наночастицы золота, коллоидное золото
ОДН	олигодезоксирибонуклеотид
ОК	отрицательный (безматричный) контроль
ОТ	обратная транскрипция/обратно-транскрипционный
п.о.	пары оснований
ПАКК	протяженный продукт АКК
ПАО	псевдоаутосомный локус
ПД	димеры праймеров
ПК	положительный контроль
ПО	программное обеспечение
ПЦР	полимеразная цепная реакция
ПЦР-РВ	полимеразная цепная реакция в реальном времени
т.п.о.	тысяча пар оснований
ТКК	транскрипция "катящимся кольцом"
Трис	трис(гидроксиэтил)аминометан
УДГ	урацил-ДНК-гликозилаза
УЗ/УЗ-	ультразвук/ультразвуковой
УФ/УФ-	ультрафиолет/ультрафиолетовый
УФА	Ультразвуковая Фрагментация и Амплифликация
ΦΒC	функционально активные вторичные структуры
ΦΓ	фосфорилгуанидиновые группы
фДНК	фрагментированная ДНК
цв-ДНК-пол	цепь-вытесняющие ДНК-полимеразы
ЦТАБ	цетилтриметиламмония бромид
ЭДТА	динатриевая соль N,N,N',N'-этилендиаминтетрауксусной кислоты
ЭСР	экспоненциальная стадия реакции

введение

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; Vajpayee et al., 2023]. 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 способом амплификации НК является полимеразная цепная реакция (ПЦР), характеризующаяся достаточной чувствительностью и специфичностью при относительной простоте исполнения [Waters, Shapter, 2014; 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; Boonbanjong et al., 2022; 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 (разновидностей) НКсодержащих образцов. В последнее время значительное внимание уделяется исследованию короткоцепочечных НК (кцНК), таких как фрагментированные или разрушенные ДНК и РНК (например, древняя ДНК) и микроРНК. Разрушенные НК встречаются не только в объектах биологического происхождения, подвергнувшихся воздействию внешних факторов; фрагментация НК происходит при любых манипуляциях: при их выделении, интенсивном перемешивании, фильтрации, замораживании и последующем оттаивании водных растворов. Целенаправленное расщепление цепей ДНК проводят с помощью ультразвука при подготовке ДНК-библиотек для NGSсеквенирования.

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 НКцепей подбор оптимальных нуклеотидных последовательностей мишеней для разрушенных НК затруднен. В связи с этим вопрос о степени 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 "катящимся кольцом" (в варианте рамификации). Основной проблемой при использовании таких праймеров является сложность дискриминации целевых ампликонов и продуктов неспецифического ДНК-синтеза. Кроме того, для коротких НК-мишеней облегчено образование побочных продуктов амплификации, поскольку кцНК обладают праймероподобными свойствами и обусловливают более высокую эффективность фальшпраймирования.

Необхолимость обеспечения высокой специфичности и чувствительности обнаружения любых НК-мишеней очевилна. олнако достижение требуемых аналитических характеристик в некоторых случаях затруднено. Нередко это связано с особенностями строения и/или свойствами молекулярных компонентов амплификационных систем. Так, обнаруженная относительно недавно предпочтительность расщепления ДНК по определенным сайтам обусловливает необходимость выявления последовательностей, которые в меньшей степени подвержены разрушению под действием механических сил и, как следствие, способны обеспечить большую достоверность анализа. Эффективность и специфичность амплификации НК зависит 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 на начальном этапе амплификации побочных матриц приводит по мере протекания реакции 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 особенностей взаимодействия НК и отдельных ДНКполимераз, 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 (праймеров с новыми типами химических модификаций, генно-инженерных полимераз, репортерных систем), 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 указанной цели были поставлены следующие задачи:

- 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;
- 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-ампликонов), показано влияние размера молекул и природы среды на скорость расщепления. Впервые предложено использовать количественую 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 принципиально 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 разрушительному 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 цепьвытесняющие ДНК-полимеразы способны вызывать мультимеризацию ДНК. На примере ДНК-полимеразы Bst большого фрагмента (Bst определены условия, exo-) способствующие мультимеризации, и предложены способы ее предотвращения. Раскрыт механизм данной 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 миРНК и обнаружения вирусных РНК. Разработан способ получения небольших одноцепочечных кольцевых ДНК-матриц из разрушенной дцДНК с помощью Т4 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 бо́льшую реакционную специфичность.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты работы способствуют более глубокому пониманию процессов, происходящих при фрагментации молекул НК под действием механических сил и протеканием неспецифического ДНК-синтеза связанных с при амплификации разрушенных НК-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 бо́льшую достоверность результатов изотермической амплификации. Полученные в рамках диссертационной работы данные могут применяться непосредственно при постановке амплификационных экспериментов, начиная с подбора нуклеотидных последовательностей мишеней и праймеров и заканчивая интерпретацией результатов. Они могут найти применение как в научных исследованиях, так и в практике лабораторий экспертизы в криминалистических центрах, учреждениях Роспотребнадзора, в медицинской диагностике.

Положения, выносимые на защиту:

 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.

- Наличие 5-метилцитозина обусловливает бо́льшую 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 Таq.
- 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 полностью 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 Bst exo- способна обеспечить амплификацию ДНК в присутствии не только ионов Mg²⁺ и Mn²⁺, но также Ca²⁺, Cd²⁺ и Cu²⁺. Она образует более прочные комплексы с пурин-богатыми нуклеотидными последовательностями, что обусловливает для них бо́льшую эффективность мультимеризации.

Методология и методы исследования

Методология исследования основана на использовании системного подхода с применением методов биоорганической химии, аналитической биохимии, молекулярной биологии, молекулярного моделирования, статистики, а также на анализе данных отечественной и зарубежной литературы. Основные методы исследования включали: выделение нуклеиновых кислот (тотальной ДНК, РНК, микроРНК) из различных биоматериалов, в том числе подвергнувшихся действию факторов внешней среды, конструирование олигонуклеотидных матриц и праймеров, химический синтез

олигонуклеотидов, амплификацию нуклеиновых кислот (различные варианты полимеразной цепной реакции изотермической амплификации), И гельэлектрофоретический анализ, клонирование И секвенирование, молекулярное моделирование и докинг, выполненные с использованием современного оборудования и программного обеспечения.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 1.5.4 – Биохимия (химические науки) и затрагивает проблемы, связанные с исследованием биополимеров, в частности, проблемы строения, свойств и функционирования отдельных молекул и надмолекулярных комплексов. Работа включает исследование структуры И функциональной активности комплексов неорганических ионов с органическими молекулами, расчеты на уровне функционирования отдельных биомолекул, компьютерное моделирование пространственной структуры биополимеров и надмолекулярных комплексов, развитие методов генодиагностики.

Апробация результатов исследования

Основные научные результаты диссертационной работы были представлены на II Международной конференции "Физико-химическая биология" (Новосибирск, 2011), Международной конференции "Постгеномные технологии лля биомедицины" (Новосибирск, Ш Международной научно-практической 2012). 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), Всероссийской конференции с международным участием "Биотехнология – от науки к практике" (Уфа, 2014), 19-ой, 20-ой, 22-ой, 24-ой Международных пущинских школах-конференциях молодых ученых "Биология - наука XXI века" (Пущино, 2015, 2016, 2018, 2020), II Всероссийской молодежной научной конференции "Фундаментальные и прикладные аспекты современной биологии" (Томск, 2015), Всероссийской научной конференции "Актуальные вопросы фундаментальной и экспериментальной биологии" (Уфа, 2016), 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 42 статьях в рецензируемых журналах, из них индексируемых в Web of Science/Scopus – 23; 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.

Автор выражает благодарность своему научному консультанту, д.б.н., проф. Чемерису А.В. за многолетнее плодотворное сотрудничество, сотрудникам лаборатории структуры и функций биополимеров ИБГ УФИЦ РАН, всем коллегам, принимавшим участие в выполнении совместных работ. Имена соавторов указаны в соответствующих публикациях.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Обнаружение специфических нуклеотидных последовательностей является основой современных методов ДНК- и РНК-анализа, который осуществляют, как правило, путем наработки фрагментов нуклеиновых кислот (НК) с помощью реакций амплификации с последующей детекцией результатов различными способами. На сегодняшний день предложено множество вариантов амплификации НК для решения широкого спектра задач. Применение того или иного метода зависит от вида и качества анализируемой HK, требований К достоверности результата, возможностей исследователей и пр. Несмотря на кажущееся многообразие методов НК-анализа, до сих пор затруднено исследование ряда объектов: короткоцепочечных НК (фрагментированная ДНК, древняя ДНК, микроРНК), низкокопийных НК и др. Кроме того, постоянно ведется разработка новых методов для изучения структуры и свойств НК (полиморфизма, статуса метилирования ДНК и др.), а также совершенствование существующих подходов путем их комбинирования или перевода в более производительные форматы.

Использование того или иного метода амплификации в молекулярной диагностике нередко ограничивается его неудовлетворительной достоверностью. Особенно ярко это проявилось в 2020 году, когда при многообразии тест-систем для выявления PHK коронавируса SARS-CoV-2 наблюдалась проблема так называемых "пропущенных" и бессимптомных пациентов с COVID-19, обусловленная в том числе высокой долей ложных результатов. Так, в ряде статей, опубликованных по итогам исследований во время эпидемии SARS-CoV-2 в Китае в первые месяцы 2020 г., сообщалось о шокирующе низкой (около 50% [Liu et al., 2020; Xie et al., 2020]) эффективности ПЦР-тестов на этот вирусный патоген. Казалось бы, неудовлетворительная достоверность молекулярной диагностики в случае SARS-CoV-2 могла быть обусловлена несколькими очевидными причинами: условиями получения генетического материала (забор биоматериала, транспортировка, пробоподготовка), недостаточной стабильностью PHK, качеством реагентов, квалификацией специалистов. Однако существенное влияние, на наш взгляд, могут оказывать причины, обусловленные неизученными свойствами молекулярных компонентов амплификационных систем.

1.1. АМПЛИФИКАЦИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Наиболее используемым методом амплификации НК является полимеразная цепная реакция (ПЦР) [Saiki et al., 1985; Mullis et al., 1987; Waters et al., 2014], характеризующаяся значительными возможностями при относительной простоте, высокой чувствительности и низкой себестоимости. В силу причин, ограничивающих применимость ПЦР, получили развитие методы амплификации, протекающие в изотермическом режиме [Бодулев, Сахаров, 2020], не требующие дорогостоящего оборудования для термоциклирования, что позволяет использовать для их проведения портативные устройства, в том числе функционирующие в формате lab-on-chip [Fakruddin et al., 2013; Qi et al., 2018]. Предложено множество разновидностей изотермической амплификации; наиболее популярными являются петлевая изотермическая амплификация – LAMP (англ. Loop-mediated AMPlification) [Notomi et al., 2000] и амплификация "катящимся кольцом" – AKK (англ. Rolling Circle Amplification, RCA) [Fire, 1995].

1.1.1. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

ПЦР – наиболее используемый метод амплификации НК. На сегодняшний день он является "золотым стандартом" при проведении НК-анализа любых образцов биологического происхождения [Waters et al., 2014; Biassoni, 2020]. В классическом варианте ПЦР проводят с помощью двух праймеров, один из которых условно называется прямым (forward, F), второй – обратным (reverse, R). Праймеры ограничивают амплифицируемую область и определяют размер целевого продукта амплификации – ампликона (рис. 1.1). Для обеспечения денатурации (расхождения) цепей ДНК, отжига (молекулярной гибридизации) праймеров и построения (синтеза) новых цепей используют термоциклирование, в связи с чем ПЦР является реакцией, управляемой сменой температурных режимов.

ПЦР – высокочувствительная и высокоспецифичная реакция амплификации, однако для нее характерно получение в некоторых случаях ложноотрицательных или ложноположительных результатов. Первые могут быть следствием некачественного подбора праймеров (во избежание этого в диагностикумы включают положительный контроль), особенностей нуклеотидной последовательности матрицы (GC-богатый состав, значительная длина, наличие повторов или палиндромов, мутации, делеции, инсерции в местах отжига праймеров) или наличия ингибиторов амплификации.

Ложноположительные результаты возникают, как правило, за счет кросс-контаминации реактивов и рабочего пространства.

За период, прошедший с момента разработки ПЦР, предложено свыше 150 вариантов данной реакции (с учетом вариантов детекции результатов). Среди них стоит отметить следующие наиболее важные: 1) обратно-транскрипционную ПЦР (ОТ-ПЦР), используемую для амплификации РНК, 2) ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ), позволяющую отслеживать накопление продуктов амплификации по ходу реакции и предполагающую использование репортеров (интеркалирующие красители или молекулярные зонды), 3) ПЦР с "горячим стартом", в которой синтез цепей начинается по достижении реакционной смесью определенной (высокой) температуры.



Рис. 1.1. Схема расположения прямого (F) и обратного (R) праймеров в классической ПЦР при их отжиге на цепях ДНК.

Разработка вариантов ПЦР была обусловлена необходимостью решения конкретных задач, для которых использование классической ПЦР не приводило к желаемому результату: анализ полиморфизма ДНК, обнаружение РНК-мишеней, амплификация GC-богатых фрагментов и др. Тем не менее, до сих пор вызывает затруднения анализ таких "сложных" объектов как разрушенная ДНК (ДНК из старых, древних биоматериалов или подвергшихся химическому и/или физическому воздействию) [Colotte et al., 2009; Hofreiter et al., 2021], низкокопийная ДНК (единичные молекулы анализируемой ДНК), смеси ДНК (искомая + фоновая). Для каждого из этих случаев НК-анализ становится задачей, требующей отклонений от традиционных подходов.

В последние три года глобальным вызовом в области молекулярной диагностики патогенов стал PHK-содержащий вирус SARS-CoV-2, вызвавший пандемию COVID-19. Его стремительное распространение по миру продемонстрировало неготовность человечества к масштабным биологическим угрозам и актуализировало задачи, связанные с мониторингом эпидемиологической обстановки по возбудителям вирусной и бактериальной природы. На примере коронавируса SARS-CoV-2, для которого на ранних этапах пандемии наблюдалась проблема "пропущенных" и бессимптомных пациентов при

многообразии имевшихся диагностических тест-систем, отчетливо стали заметны нелостатки существовавших способов обнаружения генетического материала инфекционных агентов. SARS-CoV-2 продемонстрировал необходимость разработки более быстрых и чувствительных методов обнаружения вирусных патогенов [Bukasov et al., 2021; Vindeirinho et al., 2022]. Потребность в обнаружении РНК SARS-CoV-2 привела к подходов, основанных изотермической амплификации, появлению новых на микрофлуидных и биосенсорных технологиях, методах геномного редактирования CRISPR и др. Тем не менее, ПЦР сохранила первенство среди всех диагностических методов [Sharma et al., 2021], несмотря на необходимость проводить перед ПЦРамплификацией реакцию обратной транскрипции (ОТ), требующей РНК-зависимой ДНКполимеразы. Было бы удобно проводить обнаружение РНК-мишеней с использованием обычной ПЦР (т.е. без этапа ОТ, с единственным ферментом), однако только в одной работе была показана возможность достоверного обнаружения РНК коронавируса SARS-CoV-2 с помощью ДНК-зависимой ДНК-полимеразы Таq после оптимизации состава буфера и протокола термоциклирования [Bhadra et al., 2020].

Одним из приложений ПЦР стал анализ метилирования ДНК, которое является одним из важнейших эпигенетических механизмов регуляции работы генов. В зависимости от состояния организма (возраст, нормальное или патологическое состояние) уровень метилирования может существенно различаться [Declerck et al., 2018; Pirola et al., 2018]. Изучение метилирования позволяет устанавливать тяжесть патологических состояний, предсказывать их прогрессирование и предлагать стратегию лечения [Klutstein] et al., 2016; Madakashira, Sadler, 2017; Elhamamsy, 2017]. Предложено большое количество способов анализа метилирования ДНК [Olkhov-Mitsel, Bapat, 2012; Kurdyukov, Bullock, 2016; Khodadadi et al., 2021], которые условно можно разделить на три большие группы: 1) методы, основанные на бисульфитной обработке ДНК (бисульфитное секвенирование, метилспецифическая ПЦР, COBRA, WGSGS, RRBS, BiMP, SMART-MSP, и др.), 2) методы, основанные на ферментативном расщеплении (метилчувствительная ПЦР, LUMA, HELP, COMPARE-MS, MCA, MSCC, и др.), и 3) методы, основанные на аффинных свойствах метилированных нуклеотидных последовательностей (MeDIP, MIRA, и др.). Предложены также высокопроизводительные подходы на основе ДНКмикрочиповых технологий и полногеномного секвенирования [Irizarry et al., 2008; Reinders et al., 2008], и основанные на использовании наноматериалов [Sina et al., 2014].

При совершенствовании ПЦР серьезное внимание уделяется сокращению продолжительности реакции, которая во многом зависит от скорости изменения температуры реакционных блоков. В большинстве термоциклеров они представлены

твердотелыми конструкциями, и смена температурных режимов происходит постепенно ввиду их инертности. Для решения этой проблемы был предложен вариант ПЦР с использованием конвекции, не требующий постоянного нагрева и охлаждения термоблока и получивший название конвекционной ПЦР (конвПЦР) [Krishnan et al., 2002]. Ее проводят в сосудах различной формы, однако первыми в качестве таковых стали применяться замкнутые трубки, движение жидкости в которых происходило под действием термогравитационной конвекции [Chen et al., 2004; Krishnan et al., 2004]. Способ проведения конвПЦР в отрезках трубок получил свое продолжение в виде карманного термоциклера, питающегося от батареек типа AA [Agrawal, Ugaz, 2006, 2007]. Еще один вариант "трубчатого" конвекционного термоциклера предложили китайские авторы [Shu et al., 2017; Chou et al., 2017]. Однако наиболее "популярным" сосудом для проведения конвПЦР стали капилляры [Muddu et al., 2011; Pryle et al., 2013; Priye, Ugaz, 2017]. Оптимизация соотношений высоты и диаметра капилляров стала одной из задач при разработке портативного конвекционного термоциклера [Chang et al., 2012; Hsieh et al., 2013]. В разработке компании Ahram Biosystems, Inc. реакционным сосудом служила открытая толстостенная стеклянная трубка [Hwang et al., 2009, 2011, 2017] или небольшие полипропиленовые пробирки конической формы, помещенные в термоблок из двух [Hwang, 2018a] или трех [Hwang, 2017, 2018b] горизонтальных пластин, разделенных изолятором. Желая масштабировать конвПЦР вниз, ряд авторов сконструировали линейку микрофлуидных чипов с замкнутым кольцевым контуром, пролегающим через температурные зоны денатурации, отжига и элонгации [Yao et al., 2007; Chung et al., 2009, 2010, 2014]. Были разработаны конвекционные ДНК-термоциклеры с детекцией результатов амплификации в режиме реального времени [Su et al., 2016; Qiu et al., 2017].

За последние годы опубликовано значительное число статей, в которых описывается использование конвПЦР для детекции разнообразных этиологических агентов, главным образом вирусной природы, в том числе РНК-содержащих вирусов у человека и домашних животных [Balasuriya et al., 2014; Wilkes et al., 2015; Soltan et al., 2016; Ambagala et al., 2017; Carossino et al., 2017; Lung et al., 2017; Cook et al., 2018; Cooke et al., 2018; Lauterbach et al., 2018; Ruggiero et al., 2018]. Помимо обнаружения вирусов, конвПЦР использовалась для выявления бактериальной и грибной инфекции, а также для обнаружения носительства простейших [Chua et al., 2016; Kuo et al., 2017; Wu et al., 2017]. Таким образом, за прошедшие почти два десятилетия существования конвПЦР она доказала свою жизнеспособность, и в настоящее время разработаны различные варианты этого метода с одним, двумя или даже тремя источниками нагрева и разнообразной формой реакционных сосудов.

1.1.2. Петлевая изотермическая амплификация (LAMP)

Самой популярной из изотермических реакций амплификации НК является петлевая изотермическая амплификация – LAMP (Loop-mediated AMPlification) [Notomi et al., 2000], характеризующаяся сложной системой праймеров (рис. 1.2).



Рис. 1.2. Схема мест отжига праймеров в LAMP.

В первоначально предложенном варианте LAMP использовались два внешних – F3 (Forward) и B3 (Backward), и два внутренних – FIP (Forward Inner Primer) и BIP (Backward Inner Primer), праймера. Прямой и обратный праймеры F3 и B3 необходимы для образования одноцепочечной ДНК и требуются только на начальном этапе, в связи с чем они берутся в реакцию в заметно меньшем количестве. Мотивы F1c и B1c в составе FIP и ВІР отжигаются позже на синтезирующихся цепях ДНК. За счет них формируются гантелеподобные (dumbbell) структуры, запускающие наработку продуктов разной длины – лампликонов. Для ускорения наработки лампликонов было добавлено еще два праймера, отжигающихся на участках между последовательностями F1c и F2, а также между B1c и В2 на образующихся петлях, получившие название петлевых (FLP и BLP, или LoopF и LoopB) [Nagamine et al., 2002]. Впоследствии другими авторами вместо петлевых было предложено использовать Stem-праймеры – StemF и StemB, отжигающиеся внутри мишени (внутри лампликонов) на участке между прямым и обратным праймерами FIP и BIP [Gandelman et al., 2011]. Иное усовершенствование праймерной системы заключалось в добавлении вместо петлевых праймеров так называемых Swarm-праймеров [Martineau et al., 2017]. Поскольку температура протекания LAMP (около 65°C) относительно высока для анализов по месту лечения (англ. point-of-care testing, POCT), было рекомендовано использовать фосфотиоатные LAMP-праймеры, что позволило снизить температуру реакции до 40°С с сохранением ее эффективности и специфичности [Cai et al., 2018].

Для анализа результатов LAMP-амплификации предложен очень широкий спектр различных способов (табл. 1.1). Наиболее простым и очевидным стал гель-электрофорез. Он был использован в оригинальной работе Notomi с соавт. [Notomi et al., 2000], но для подтверждения амплификации целевого фрагмента ДНК авторы провели Саузерн-блот с

дигоксигенин-меченой пробой, комплементарной участку между праймерами FIP и BIP. Дополнительно проводили расщепление лампликонов несколькими рестрикционными эндонуклезами. Однако оба метода затратны по времени и не могут быть рекомендованы при проведении массовой LAMP-диагностики. Лучшим подтверждением мишеньспецифичности LAMP является секвенирование лампликонов [Imai et al., 2017], однако ввиду высокой стоимости оно также не получило распространения.

метод	репортер/репортерная система	источники
анализа		
турбиди-	пирофосфат магния	[Mori et al., 2004], [Sappat et al., 2011]
метрия	комплекс "полиэтиленимин-	[Mori et al., 2006]
	ДНК"	
	гидроксид меди	[Zhang et al., 2009], [Zoheir, Allam, 2010]
колори-	кристаллический фиолетовый	[Miyamoto et al., 2015], [Roy et al., 2017]
метрия	метиленовый синий	[Trieu, Lee, 2019]
	гидрооксинафтоловый синий	[Goto et al., 2009]
	эриохром черный Т	[Oh et al., 2016]
	малахитовый зеленый	[Nzelu et al., 2014], [Lucchi et al., 2016]
	наночастицы золота	[Seetang-Nun et al., 2013], [Wong et al., 2014],
		[Manajit et al., 2018]
	наночастицы диоксида	[Zhang et al., 2019]
	кремния	
	рН-чувствительные красители	[Tanner et al., 2015], [Poole et al., 2017],
	(феноловый красный,	[Jaroenram et al., 2019]
	крезоловый красный,	
	нейтральный красный,	
	ксиленоловый оранжевый)	
рН-метрия	рН-чувствительный сенсор на	[Veigas et al., 2014]
	основе пентаоксида тантала	
флуори-	кальцеин	[Tomita et al., 2008]
метрия	интеркалирующий краситель	[Iwamoto et al., 2003], [Hong et al., 2012],
	SYBR Green I	[Liang et al., 2013], [Karthik et al., 2014]
	интеркалирующие красители	[Seyrig et al., 2015], [Oscorbin et al., 2016],
	группы SYTO	[Quyen et al., 2019]
	Miami Yellow	[Quyen et al., 2019]

Таблица 1.1. Некоторые способы детекции результатов LAMP.

	берберин	[Fischbach et al., 2015]
	флуорофор – тушитель	[Tani et al., 2007], [Kouguchi et al., 2010], [Ball
	флуоресценции (FRET-	et al., 2015], [Takayama et al., 2019]
	эффект)	
	гибридизационные зонды	[Yi et al., 2006], [Tanner et al., 2012], [Liang et
		al., 2012], [Wang et al., 2015], [Yaren et al.,
		2016a], [Zhu et al., 2017], [Liu et al., 2017],
		[Higgins et al., 2018], [Nanayakkara, White,
		2019], [Ding et al., 2019, 2020]
люминес-	люциферин + люцифераза	[Gandelman et al., 2010], [Lee et al. 2020]
ценция		
электро-	метиленовый синий	[Nagatani et al., 2011], [Hsieh et al., 2012], [Liu
химические		et al., 2014], [Luo et al., 2014]
	ионы магния	[Liu et al., 2013]
	Hoechst 33258	[Ahmed et al.,2009], [Jaroenram et al., 2020]
	хлорид гексамминрутения	[Ahmed et al., 2013], [Hashimoto et al., 2017]
иммунохро-		[Kiatpathoomchai et al., 2008], [Lee et al., 2009],
матография		[Jaroenram et al., 2009, 2020], [Jung et al., 2015],
		[Phillips et al., 2018], [Gong et al., 2021]

Особенностью LAMP-амплификации является наработка значительного количества ДНК-продуктов, приводящая к накоплению пирофосфата. Последний связывается с ионами магния и образует нерастворимый осадок:

$$P_2O_7^{2+} + 2Mg^{2+} \rightarrow Mg_2P_2O_7\downarrow,$$

что приводит к заметному помутнению раствора. Уже в одной из первых работ, появившихся после разработки LAMP, сообщалось об изменении мутности реакционной смеси, которую можно контролировать, например, с помощью ИК-спектроскопии [Mori et al., 2001] и даже визуально ("на глаз") [Le Roux et al., 2009]. Разработаны специальные приборы – турбидиметры, позволяющие оценивать изменение мутности в режиме реального времени [Mori et al., 2004; Sappat et al., 2011]. В одной из работ приведены данные по сравнительной оценке функционала турбидиметра LA-500 фирмы Eiken Chemical Co. и ДНК-термоциклера iCycler iQ [Aoi et al., 2006]. Могі et al. был предложен еще один способ регистрации результатов LAMP: по образованию плохо растворимого в воде комплекса полиэтиленимина с ДНК [Mori et al., 2006]. Добавление 0,1 мМ CuSO4 в реакционную смесь после завершения LAMP приводит к образованию осадка Cu(OH)2 в

тех образцах, где не произошла амплификация, что авторы объяснили взаимодействием неизрасходованных дНТФ с сульфатом меди [Zhang et al., 2009; Zoheir, Allam, 2010].

Интересными представляются варианты использования нефлуоресцентных красителей для оценки результатов LAMP, среди которых одним из наиболее популярных является кристаллический фиолетовый (лейкоформа), приобретающий обычную окраску при связывании с дцДНК [Miyamoto et al., 2015; Roy et al., 2017]. Описаны варианты детекции с помощью метиленового синего [Trieu, Lee, 2019], гидрооксинафтолового синего [Goto et al., 2009], эриохрома черного Т [Oh et al., 2016]. В качестве репортерной системы нашло применение коллоидное золото (наночастицы золота, НЧЗ), для которого переход между агрегированным (синий) и дезагрегированным (красный) состояниями сопровождается изменением цвета раствора [Seetang-Nun et al., 2013; Wong et al., 2014; Manajit et al., 2018]. Относительно недавно предложен способ детекции пирофосфата после завершения LAMP-реакции, основанный на так называемом «эффекте кофейного кольца», возникающем за счет агрегации наночастиц оксида кремния [Zhang et al., 2019].

Наработка в ходе LAMP значительного количества ДНК-продуктов обусловливает заметное изменение pH реакционной смеси, что стало основой нескольких способов регистрации ее результатов. Самым простым оказался подход, заключающийся в добавлении минимально необходимого количества буферных солей и pH-чувствительных красителей (феноловый красный, крезоловый красный, нейтральный красный, ксиленоловый оранжевый) [Tanner et al., 2015; Poole et al., 2017; Jaroenram et al., 2019]. Накопление протонов предложено также регистрировать с помощью полупроводниковой СМОS-технологии с использованием pH-чувствительного сенсора на основе пентаоксида тантала [Veigas et al., 2014].

Флуориметрическая детекция представлена наибольшим количеством способов генерации аналитического сигнала: с помощью металлоиндикатора кальцеина [Tomita et al., 2008], интеркалирующих красителей, например, SYBR Green I [Iwamoto et al., 2003; Hong et al., 2012; Liang et al., 2013; Karthik et al., 2014], подходов, основанных на FRETэффекте (FRET – резонансный перенос энергии флуоресценции) [Tani et al., 2007; Kouguchi et al., 2010; Ball et al., 2015; Takayama et al., 2019], флуорогенных зондов. Среди интеркалирующих красителей наиболее подходящими для детекции продуктов LAMP были признаны SYTO-82, SYTO-84 и SYTOX Orange [Seyrig et al., 2015], SYTO-9 и SYTO-82 [Oscorbin et al., 2016], SYTO-9, SYTO-82, SYTO-16, SYTO-13 [Quyen et al., 2019], а также Miami Yellow [Quyen et al., 2019], берберин [Fischbach et al., 2015]. Флуорогенные зонды – меченые флуорофором и тушителем флуоресценции олигонуклеотиды, в том числе расщепляемые эндонуклеазами, обеспечивают наивысшую специфичность детекции

[Yi et al., 2006; Tanner et al., 2012; Liang et al., 2012; Wang et al., 2015; Zhu et al., 2017; Higgins et al., 2018; Nanayakkara, White, 2019]. В качестве подобных зондов в LAMP довольно поздно стали использоваться так называемые молекулярные маяки, или биконы (molecular beacons) [Yaren et al., 2016a; Liu et al., 2017; Ding et al., 2019; 2020]. Отдельно можно отметить биолюминесцентные способы регистрации результатов LAMP [Gandelman et al., 2010; Lee et al. 2020].

Считается, что электрохимические методы детекции продуктов амплификации НК имеют ряд преимуществ перед оптическими. Основой электрохимической детекции лампликонов являются электроактивные соединения, среди которых наибольшее распространение получил краситель метиленовый синий, интеркалирующий в двуцепочечную ДНК [Nagatani et al., 2011; Hsieh et al., 2012; Liu et al., 2014; Luo et al., 2014]. Другими электроактивными интекаляторами, примененными в LAMP, стали краситель Ноеchst 33258 [Ahmed et al., 2009; Jaroenram et al., 2020] и хлорид гексамминрутения [Ahmed et al., 2013; Hashimoto et al., 2017]. Понижение концентрации ионов магния за счет его связывания с пирофосфатом в случае успешно протекающей LAMP детектировали с помощью потенциометрии [Liu et al., 2013].

Весьма распространенным вариантом обнаружения целевых продуктов LAMP стал иммунохроматографический анализ на специальных тест-полосках (метод LFD) [Kiatpathoomchai et al., 2008; Jaroenram et al., 2009; Jung et al., 2015; Jaroenram et al., 2020; Gong et al., 2021; Gong et al., 2021]. Стоит упомянуть также вариант LAMP-ELISA [Lee et al., 2009], который, однако, не нашел широкого применения. Было показано, что в силу различий в температуре плавления лампликонов можно детектировать в одной LAMPреакции разные мишени с помощью плавления с высоким разрешением (HRM) [Mahony et al., 2013; Dong et al., 2018]. С целью улучшить разрешающую способность данного подхода было предложено добавлять в реакционную смесь пирофосфатазу [Tone et al., 2017]. Поскольку в процессе LAMP-амплификации происходит изменение показателя преломления раствора, вызванное накоплением в нем ДНК и пирофосфата магния, появляется возможность использовать спектроскопию поверхностного плазмонного резонанса [Chuang et al., 2012; Yang et al., 2012]. LAMP была совмещена с детекцией увеличивающегося количества ДНК с помощью пьезоэлектрического микровзвешивания [Prakrankamanant et al., 2013]. Микрофлуидный биосенсор позволил детектировать лампликоны в вертикальном магнитном поле [Zhi et al., 2014]. Описана оптомагнитная детекция продуктов LAMP [Minero et al., 2017]. Недавно сообщалось об использовании поверхностно-усиленной рамановской спектроскопии (SERS) для измерения агрегации НЧЗ, вызванной накоплением пирофосфата [Teixeira et al., 2020].

LAMP наиболее востребована для быстрой высокочувствительной детекции генетического материала бактериальных и вирусных патогенов, в том числе при проведении POCT-анализов [Sadeghi et al., 2021; Soroka et al., 2021; Park, 2022; Garg et al., 2022]. С началом пандемии COVID-19 данный метод стал активно применяться в диагностике SARS-CoV-2 [Moore et al., 2021; Li et al., 2022]. В меньшей степени известно о его использовании для обнаружения ряда других НК-мишеней, например, микроРНК. Для обнаружения микроРНК с помощью LAMP применяются отличающиеся от классического варианта системы праймеров и матриц. В самом простом варианте, микроРНК использовалась в качестве внешнего праймера, например, вместо F3 [Li et al., 2011]. Схожую работу выполнили другие авторы, назвавшие свой метод ТТ-LAMP (Target-triggered) [Sun et al., 2017]. Иной подход для детекции микроРНК основан на лигировании FIP и BIP на поддерживающей матрице, приготовленной на основе микроРНК путем ее удлинения с помощью poly(A)-РНК-полимеразы, отжиге на достроенном участке олиго-dT-праймера и синтеза кДНК [Du et al., 2016]. В еще одной работе для детекции микроРНК также применялся этап ОТ с использованием специальной пробы SL [Abdullah Al-Maskri et al., 2020].

Важным является установление жизненного статуса этиологических агентов [Баймиев и др., 2020]. Сообщалось об использовании микрофлуидной технологии и метиленового синего для колориметрической детекции продуктов LAMP при определении жизненного статуса Escherichia coli O157:Н7 и Salmonella spp. [Trieu, Lee, 2019]. Для определения времени повреждения мембран микроорганизмов Vibrio parahaemolyticus в морском окуне при хранении рыбин была также использована LAMP [Telli, Dogruer, 2019]. Сравнение различных подходов для определения жизненного статуса сальмонеллы S.enterica с помощью ПЦР, ОТ-ПЦР, LAMP, RT-LAMP и культуральным методами показало, что молекулярно-биологические подходы сопоставимы по чувствительности с культуральными, но имеют преимущество в скорости [Techathuvanan, D'Souza, 2020]. Дифференциация с помощью LAMP живых и мертвых бактерий S.typhimurium в модельном эксперименте с мясом курицы из супермаркета, искусственно загрязненным разными количествами патогена, проводилась путем регистрации мутности раствора с помощью смартфона в реальном времени [Wang et al., 2020]. В другой работе исследовался VBNC-статус *Campylobacter jejuni* при ее нахождении в различных пищевых продуктах [Petersen et al, 2021]. Недавно сообщалось о дифференциации живых и мертвых бактерий Lactobacillus salivarius в кормах для животных [Fei et al., 2021].

Генотипирование проводится с помощью LAMP ограниченно, но в последние годы наблюдается рост интереса к такому применению метода. Способы выявления

однонуклеотидного полиморфизма (SNP) с помощью LAMP предлагались уже самими разработчиками этой реакции [Kazuhara et al., 2005]. В более ранней публикации этой же группы авторов описывалось SNP-типирование с помощью аллель-специфичной LAMP (AS-LAMP) [Iwasaki et al., 2003]. При использовании AS-LAMP предложено располагать дискриминирующие нуклеотиды на 3'-конце праймеров F3 или FIP [Carlos et al., 2017; Khammanee et al., 2021], на 5'-конце FIP и BIP [Yamanaka et al., 2018] или размещать их в гибридизационных зондах. Еще один вариант AS-LAMP включал использование дополнительных Loop-праймеров, один из которых нес замену на 3'-конце и не был способен выступать в качестве затравки при построении цепи ДНК [Ding et al., 2019]. Предложено также при выявлении SNP после LAMP-амплификации (первый этап) проводить инвазивное расщепление (второй этап) специальных ОДН с помощью Flapэндонуклеаз, способных узнавать необычно спаренные нуклеотиды и расщеплять в таких местах фосфодиэфирную связь [Lu et al., 2017]. Довольно простой метод выявления мутаций, в том числе одновременно нескольких, основан на определении температуры плавления лампликонов в режиме HRM [Abildgaard et al., 2018]. SNP детектировали также в реальном времени с помощью молекулярных биконов [Varona, Anderson, 2019].

Как альтернатива методу ПДРФ (Полиморфизм Длин Рестрикционных Фрагментов) предложен mLAMP-RFLP в мультиплексном варианте, с помощью которого в искусственно загрязненном молоке были выявлены бактерии родов *Shigella* и *Salmonella* [Shao et al., 2011]. В схожей работе других авторов в праймеры FIP и BIP между их частями F1c/F2 и B1c/B2 были добавлены сайты рестрикционной эндонуклеазы EcoRI, что по завершении амплификации и рестриктазного расщепления позволило выявить четкие различия между вирусами хризантем [Liu et al., 2014]. Еще один способ выявления мутаций включал использование PNA-пробы, блокирующей отжиг LNA-праймера на петле [Itonaga et al., 2016]. Такой же подход с PNA- и LNA-пробами и праймерами был применен для детекции мутаций с помощью микрофлуидного чипа [Cao et al., 2018].

Расширение сфер применения LAMP привело к тому, что с ее помощью стали определять половую принадлежность биоматериалов, включая биоматериалы человека [Nogami et al., 2008; Kitamura et al., 2018; Scott et al., 2019; Nguyen, Seo, 2021]. Описан также модельный эксперимент, ставивший целью сравнить эффективность ПЦР и LAMP при выявлении SRY-локуса [Kanchanaphum, 2018]. Но впервые пол с помощью LAMP был определен в экспериментах по имплантации зародышей у КРС [Hirayama et al., 2004]. Определяли с помощью LAMP половую принадлежность источников и других биоматериалов [Centeno-Cuadros et al., 2017; Fujita et al., 2017].

1.1.3. Амплификация "катящимся кольцом"

Амплификация "катящимся кольцом" – АКК (англ. Rolling Circle Amplification, RCA) занимает особое место среди остальных методов изотермической амплификации. Это единственная реакция, позволяющая синтезировать НК-продукты с желаемой задаваемой) нуклеотидной последовательностью. Ее (искусственно характерной особенностью является использование кольцевых НК-матриц (КМ), при соответствующем дизайне которых становятся возможными комбинирование с другими ферментативными реакциями, различными репортерными системами, проведение биоанализа в растворе, на поверхности твердых материалов или в живых клетках, а также перевод в форматы. высокопроизводительные В отличие ОТ способов всех остальных амплификации, АКК может использоваться не только как способ размножения и последующей детекции молекул аналита – НК, но и как инструмент для получения HK, опосредующих обнаружение функционально активных иных мишеней. Универсальность АКК обусловила разработку множества разнообразных методов биоанализа, нашедших отражение в огромном количестве научных публикаций и послуживших основой для создания портативных микрофлюидных, электрохимических и биосенсорных диагностических устройств [Ali et al., 2014]. Несмотря на широкие возможности, АКК применяется в первую очередь в молекулярной диагностике, обеспечивая высокую специфичность И чувствительность обнаружения таких биоаналитов как НК и белки.

АКК как метод увеличения количества аналита используется только в отношении НК, в остальных случаях реакцию совмещают с распознаванием биомишени специфическим рецептором. В зависимости от природы аналита (НК, белок, малая органическая молекула), особенностей анализируемого образца (происхождение, аналитическая чистота, наличие совместно выделяющихся веществ и пр.) и используемого инструментария, АКК в качестве отдельного, самостоятельного этапа может занимать разное положение в биоаналитическом протоколе. Можно выделить три варианта использования данной реакции амплификации в анализе (рис. 1.3).

Вариант 1, применяемый при анализе НК, включает АКК как этап амплификации или непосредственно мишени, или КМ, полученной с ее участием. По варианту 2, аналит распознается с помощью продуктов АКК, формирующих функционально активные вторичные структуры (ФВС), а для проведения реакции используют предварительно синтезированную КМ. Этот путь, обеспечивающий повышение концентрации аналита, универсален и реализуется для широкого круга биомишеней. Согласно варианту 3, аналит

распознается с помощью рецептора, связанного с НК, выступающей, как правило, праймером для АКК или НК-захватывающим зондом. Данный путь используется чаще в технологиях твердофазного анализа, когда фиксируют аналит на подложке и проводят реакции синтеза, расщепления или гибридизации НК у поверхности твердой фазы.



Рис. 1.3. Варианты включения амплификации "катящимся кольцом" как отдельного этапа в протокол биоаналитического исследования.

Специфичность АКК-анализа определяется типом аналита и технологией его обнаружения. В целом, бо́льшую специфичность обеспечивают подходы, в которых реакция АКК приводит к повышению концентрации аналитического агента и/или усилению аналитического сигнала. Предложенные на сегодня методы АКК-анализа характеризуются высокой чувствительностью с пределами обнаружения в среднем на уровне фемтомолярных (для НК) и пикомолярных (для белков) концентраций.

Ключевыми участниками АКК являются: одноцепочечная кольцевая матрица, как минимум один праймер, отжигающийся на КМ ("затравочный" праймер) и полимераза с цепь-вытесняющей активностью [Fire, Xu, 1995]. КМ может содержать несколько разных олигонуклеотидных мотивов, ответственных, например, за связывание с мишенью, с праймером и за образование ФВС продуктом АКК. После отжига праймера на КМ начинается синтез ее комплементарной копии, который продолжается до тех пор, пока полимераза не дойдет до 5'-конца праймера (рис. 1.4). Далее фермент вытесняет мешающую ему цепь и продолжает синтез по кольцу, делая множество оборотов и нарабатывая протяженный одноцепочечный продукт АКК (далее ПАКК), длина которого может составлять десятки, сотни и даже тысячи тандемных повторов в зависимости от процессивности фермента [Мohsen, Kool, 2016].



Рис. 1.4. Ключевые компоненты реакционной системы и протекание АКК. Для кольцевой матрицы разными зонами выделены мотивы, ответственные за связывание с мишенью (I), с праймером (II) и за образование ФВС продуктом АКК (III).

АКК осуществима не только с кольцевыми ДНК-, но и с РНК-матрицами. В последнем случае реакцию чаще называют транскрипцией "катящимся кольцом" (ТКК), по своей сути являющейся разновидностью АКК, поскольку для нее характерны те же базовые признаки и параметры, что и для АКК с использованием ДНК-матриц. Единственное существенное отличие заключается в применении РНК-зависимых полимераз, и инициация транскрипции может требовать наличия промоторных последовательностей, что накладывает ограничения при дизайне КМ и праймеров.

Как правило, КМ получают из олигонуклеотидов-предшественников, называемых "С-проба" (англ. C-probe, padlock), путем циклизации их с помощью ДНК- или РНК-лигаз или посредством химического лигирования. В качестве С-проб обычно используют линейные ДНК или РНК протяженностью около 40-60 нт, однако имеются данные о замыкании как коротких (от 13 нт при химическом лигировании и от 25 нт при ферментативном лигировании), так и относительно протяженных (до 105 нт) олигонуклеотидов. Циклизация НК может осуществляться матричным и нематричным способами. Первый вариант заключается в отжиге С-пробы на так называемой "поддерживающей матрице" (англ. splint); в этом случае С-проба имеет по обоим концам нуклеотидные последовательности протяженностью 10-20 нт, комплементарные поддерживающей матрице [Banér et al., 2001]. Более короткие участки отжига (суммарно менее 15 нт) снижают устойчивость формирующейся дуплексной структуры, а протяженные повышают эффективность межмолекулярного взаимодействия, приводящего к образованию линейных продуктов [An et al., 2017]. Отожженные концы С-

пробы задают таким образом, чтобы они располагались "встык" друг к другу и образовывали ник. В случае анализа НК-мишени в качестве поддерживающей матрицы часто выступает непосредственно детектируемая НК.

Матричный синтез КМ чаще всего ведут с помощью Т4 ДНК-лигазы, однако при анализе РНК используют лигазы с меньшей субстратной специфичностью, например, ДНК-лигазу вируса хлореллы (коммерческая лигаза SplintR) или Т4 РНК-лигазы [Lohman t al., 2014]. Нематричное лигирование не требует присутствия поддерживающей матрицы; его осуществляют с помощью Т4 РНК-лигаз или CircLigase. Хотя нематричное лигирование обеспечивает низкий выход целевого продукта, данный способ незаменим при изучении образцов НК неопределенного состава и при анализе короткоцепочечных НК, например, фрагментированной ДНК или малых РНК. Кроме того, известны способы повышения выхода КМ при лигировании за счет использования агентов молекулярного краудинга, таких как полиэтиленгликоль [Sasaki et al., 2020].

Циклизация НК химическим способом в отдельных случаях является более удобной альтернативой лигазам, однако требует использования дополнительных реагентов или модифицированных С-проб. Наиболее ранние способы замыкания олигонуклеотидов заключались в конденсации 5'-концевого фосфата и 3'-гидроксигруппы под действием карбодиимида или бромциана [Dolinnaya et al., 1993], 5'-концевого йодтимидина с 3'-фосфотиоатом [Xu, Kool, 1997]. Позднее были предложены подходы, основанные на методах "клик-химии", в первую очередь азид-алкиновом циклоприсоединении [Устинов и др., 2010].

Размер КМ оказывает значительное влияние на АКК. Небольшие НК-кольца (<40 нт), по-видимому, малопригодны для проведения реакции. Для КМ, не превышающих в линейном двуцепочечном виде одну персистентную длину ДНК (~51 нм, или ~160 п.о. для дц-ДНК в В-форме [Hagerman, 1981]), показано, что эффективность АКК коррелирует с количеством витков двойной спирали: для колец, имеющих целочисленное количество витков, наблюдается наименьшая эффективность амплификации, тогда как для колец с нецелочисленным количеством – наивысшая [Joffroy et al., 2018].

Нуклеотидная последовательность КМ может быть задана таким образом, что отдельные ее участки отжигаются в пределах кольца, образуя вторичные структуры типа петли или "гантели" (англ. dumbbell), способствующие повышению эффективности циклизации С-пробы и обусловливающие наличие в ПАКК двуцепочечных фрагментов. В зависимости от используемой после АКК системы детекции результатов в структуру С-пробы могут быть включены последовательности, обеспечивающие образование ФВС: аптамеров, дезоксирибозимов, G-квадруплексов, петель и др., или несущие сайты

распознавания эндонуклеаз, участки для отжига гибридизационных зондов или гомонуклеотидные мотивы для связывания с металлическими наночастицами.

АКК возможна только под действием полимераз с цепь-вытесняющей активностью. Выбор подобных полимераз достаточно широк, но наибольшее распространение получили ДНК-полимеразы Bst exo- и Vent exo-, phi29, T7 PHК-полимераза и др. Описано также использование обратных транскриптаз для проведения ТКК [Kumar et al., 2011].

Изначально АКК рассматривалась как реакция удлинения единичного праймера, дающего только один длинный одноцепочечный продукт. В этом случае реакцию называют линейной АКК, а накопление продуктов носит арифметический характер, поскольку количество матриц, инициирующих амплификацию, остается постоянным. Чувствительность подходов, основанных на линейной АКК, низка и часто не позволяет осуществлять диагностически значимую детекцию биоаналита. Для повышения эффективности реакции используют более одного праймера. Вариант с отжигом на КМ сразу нескольких праймеров получил название "мультипраймерная АКК"; его применение оправдано для относительно больших КМ (например, плазмид) с целью получения их копий для последующего секвенирования [Maino et al., 2019]. При использовании второго праймера, отжигающегося на одноцепочечном продукте удлинения первого, коэффициент размножения ампликонов увеличивается, реакция начинает носить экспоненциальный характер за счет вытеснения синтезированных цепей, многократного отжига и удлинения праймеров (рис. 1.5). Такой вариант АКК, называемый рамификация (англ. hyperbranched RCA, ramification) [Zhang et al., 2001], получил наибольшее распространение.

В 2004 г. была разработана [Dahl et al., 2004] и позднее усовершенствована [Tian et al., 2020] АКК "от кольца к кольцу" (англ. Circle-to-Circle amplification, C2CA), которая включает повторяющиеся циклы репликации КМ, расщепления ПАКК с помощью рестриктаз, получения и репликации новых КМ. Murakami с соавт. предложили АКК, сопровождающуюся "генерацией праймеров" [Murakami et al., 2008], которая основана на расщеплении ПАКК никазой и использовании дополнительной КМ. Для всех вариантов АКК с несколькими праймирующими последовательностями употребляемым стал термин "экспоненциальная АКК".

Совместимость АКК с различными репортерными системами обусловливает возможность детекции результатов с помощью широкого спектра инструментальных методов как по конечной точке, так и в реальном времени (табл. 1.2).



Рис. 1.5. Амплификация "катящимся кольцом" в варианте рамификации (Pr1 и Pr2 – праймеры).

Вид сигнала	Репортер	Принцип функционирования
флуорес- центный	 а) интеркалирущие красители 	
	б) флуоресцентные гибридизационные зонды	F1/QD -/F2/Q
	в) флуорогенный субстрат	субстрат + [O] продукт окисления + hv
	г) флуоресцентные нуклеотиды	$\underbrace{-\overset{\times}{N}\overset{\times}{\longrightarrow}\overset{\times}{N}\overset{\times}{\longrightarrow}\overset{\times}{N}\overset{\times}{\longrightarrow}\overset{\times}{N}\overset{\times}{\longrightarrow}\overset{\times}{\longrightarrow}\overset{\times}{N}\overset{\times}{\longrightarrow}$
	 д) наночастицы металлов и металлокомплексы 	
колори- метри-	а) хромогенный субстрат	субстрат + [O] окрашенный продукт окисления

Таблица 1.2. Способы генерации аналитического сигнала, используемые в АКК-анализе.

ческий	б) колориметрические гибридизационные зонды	Красный Агрегация Синий
электро- химический	 а) гибридизационные зонды с электроактивной или проводящей меткой 	+e ^r /-e ^r
	б) НК-связывающиеэлектроактивные частицы	+e ⁻ /-e ⁻

Первыми способами регистрации продуктов АКК стали гель-электрофорез и применение интеркалирующих красителей и флуоресцентных зондов, в том числе функционирующих за счет FRET-эффекта. Перевод АКК в твердофазный формат и использование микро- и наноразмерных структур (магнитных частиц, квантовых точек, наночастиц металлов и др.) сделало возможным применение электрохимических, спектроскопических, акустических и оптических методов.

Для повышения специфичности и производительности АКК-анализа и расширения спектра инструментальных методов, применимых для регистрации его результатов, были разработаны варианты амплификации на твердой поверхности ("твердофазная" АКК). Для этого на подложке фиксируют один из НК-компонентов реакционной системы: праймер, поддерживающую матрицу или ДНК-пробу для распознавания мишени. В зависимости от метода анализа, иммобилизацию биомолекул осуществляют на поверхности стекла (формат микрочипов [Nallur et al., 2001]), полимерных материалов [Xu et al., 2017], благородных металлов, графита [Shi et al., 2014]). Вследствие стерических затруднений ферментативные процессы у поверхности протекают с меньшей эффективностью, поэтому недавно для повышения коэффициента размножения ампликонов была предложена новая стратегия, заключающаяся в совмещении АКК с технологией так называемых "ДНКходоков" (англ. DNA walker). Для этого на подложке закрепляют два или более типа ДНКпроб, одна из которых распознает исследуемую НК, остальные участвуют в генерации аналитического сигнала. После фиксации НК пробой №1 на поверхности запускается каскад из повторяющихся событий денатурации-отжига НК-структур и ферментативных реакций, приводящих к синтезу ПАКК [Chai et al., 2020].

Амплификация "катящимся кольцом" первоначально применялась в основном для обнаружения специфических нуклеотидных последовательностей, однако по мере развития и появления новых молекулярных инструментов она трансформировалась в

удобный метод исследования более сложных биообъектов, в том числе in vivo, и стала обеспечивать высокочувствительное определение аналитов разных типов. Первое применение АКК нашла в SNP-типировании [Lizardi et al., 1998; Christian et al., 2001]. Для конструируются аллель-специфичные С-пробы, этой цели циклизация которых посредством дискриминирующего лигирования возможна только при полной комплементарности З'-концевого нуклеотида С-пробы матрице (рис. 1.6). SNPтипирование с помощью АКК было переведено в производительные чиповый [Hatch et al., 1999] и мультиплексный [Faruqi et al., 2001] форматы, а также предложены подходы, совмещающие аллель-специфичное лигирование и АКК с новыми способами генерации аналитического сигнала [Гарафутдинов и др., 2009].



Рис. 1.6. Схема дискриминация полиморфных нуклеотидов с помощью аллельспецифичных С-проб при анализе однонуклеотидного полиморфизма.

Наибольшее число ранних работ по АКК было посвящено обнаружению ДНК различных организмов [Ali et al., 2014]. Например, описаны колориметрические методы определения генетического материала растительного патогена *Phytophthora infestans* [Chang et al., 2019] и бактерии *Staphylococcus aureus* [Li et al., 2020а]. Первый из них основан на АКК, запускаемой системой CRISPR/Cas9, и функционализированных НЧЗ в качестве гибридизационных зондов. Особенностью второго является многоуровневая система распознавания мишени и генерации аналитического сигнала, включающей использование биотин-меченых праймеров, дигоксин-меченых зондов, конъюгата НЧЗ с

анти-дигоксигенином и пероксидазой и окисление тетраметилбензидина пероксидазой в микропланшетах, функционализированных стрептавидином.

С развитием АКК больше внимания стало уделяться также выявлению генетического материала различных вирусов, содержащих одноцепочечные ДНК или РНК, удобных в качестве поддерживающей матрицы при циклизации специфических Спроб. В настоящее время АКК-опосредованное обнаружение вирусов реализуют как в растворе (пробирках), так и в микрофлюидных устройствах [Cao et al., 2019], в формате электрохимических биосенсоров [Gu al., 2018]. совмещают et с другими ферментативными реакциями, например, с ПЦР с обратной транскрипцией и последующей SDA [Lee et al., 2021а].

В последние годы акцент в применении АКК смещается в сторону анализа короткоцепочечных нуклеиновых кислот, в первую очередь малых и некодирующих РНК. Например, в работе [Ning et al., 2019] описан способ обнаружения малых РНК с известной длиной и последовательностью с помощью ТКК в присутствии обратной транскриптазы SuperScript IV, РНК-полимеразы *E. coli* и никазы Nb.BbvCI. Ciftci с соавт. предложили метод детекции гипервариабельных РНК-вирусов, основанный на использовании С-проб с вырожденными 3'-концевыми нуклеотидами [Ciftci et al., 2019]. Для однозначной дифференцировки изоформных РНК предложены особые варианты С-пробы – iLock-пробы [Krzywkowski et al., 2019].

Бо́льшая часть работ, посвященных применению АКК в анализе рибонуклеиновых кислот, затрагивает количественную оценку микроРНК, выступающих важным маркером при диагностике различных патологических состояний [Saliminejad et al., 2019; Cheng et al., 2018; Ye et al., 2019; Gines et al., 2020]. Один из подходов, получивший название miR-ID, заключался в циклизации микроРНК путем нематричного лигирования и последующей ТКК с обратной транскриптазой [Kumar et al., 2011]. Оригинальный способ анализа микроРНК описан в работе [Zhao et al., 2019], согласно которому АКК инициируется специальной ДНК-триплексной структурой с мотивом ТА-Т. В большинстве случаев микроРНК выступает в качестве поддерживающей матрицы при циклизации С-пробы, нередко она используется одновременно и как затравочный праймер. В таблице 1.3 с целью иллюстрации многообразия существующих подходов приведено несколько оригинальных технологий последних лет, в которых реализованы необычные способы генерации аналитического сигнала при АКК-анализе микроРНК.
Ссылка	Роль микроРНК	Принцип технологии	Предел обнаружения
[Ge et al., 2020]	поддерживающая матрица и праймер	МикроРНК обеспечивает замыкание С-пробы и праймирует АКК, продукт которой расщепляется рестриктазой до фрагментов, дающих отдельные G-квадруплексы, связывающиеся с гемом. Образующиеся комплексы катализируют окисление о-фенилендиамина до окрашенного продукта, вызывающего тушение флуоресценции квантовых точек на основе MoS ₂	4.6·10 ⁻¹⁵ M
[Liu et al., 2021]	расщепление ДНК-дуплексов и генерация праймеров	Молекулы микроРНК отжигаются на продукте АКК, получаемом с КМ №1, и образующиеся двуцепочечные структуры расщепляются дуплекс-специфической нуклеазой до фрагментов, которые далее праймируют АКК с КМ №2. Новый продукт АКК образует G-квадруплексы, связывание которых с комплексом протопорфирина IX и ионов Zn ²⁺ вызывает появление флуоресцентного сигнала.	1·10 ⁻¹⁵ M
[Kumara et al., 2020]	поддерживающая матрица и праймер	МикроРНК обеспечивает замыкание С-пробы и праймирует АКК в присутствии модифицированного нафталимидом трифосфата dUTP, что обеспечивает наработку флуоресцирующего продукта амплификации.	3.58·10 ⁻¹⁵ M
[Tang et al., 2020]	запуск каскада ферментативных реакций	МикроРНК из экзосом связываются со специальной LNA-пробой, иммобилизованной на магнитных микрочастицах, вытесняя из комплекса с ней олигонуклеотиды, которые далее гибридизуются с закрепленными на золотом электроде зондами и праймируют на его поверхности АКК. Продукт АКК образует G-квадруплексы, связывающие электроактивный краситель метиленовый синий, который обеспечивает появление электрохимического сигнала.	2.75·10 ⁻¹⁵ M
[Lu et al., 2018]	праймер	МикроРНК захватывается КМ, удерживающейся частично комплементарным ей зондом на поверхности модифицированных стрептавидином магнитных микрочастиц. МикроРНК праймирует АКК, продукт амплификации детектируется с помощью интеркалирующего красителя SGI.	1·10 ⁻¹³ M
[Cao et al., 2019]	поддерживающая матрица	МикроРНК с помощью захватывающей ДНК-пробы фиксируется на поверхности микрофлуидных каналов и опосредует последующее матричное лигирование адаптора, выступающего праймером для АКК. Расщепление продукта АКК никазой приводит к образованию новых молекул, инициирующих амплификацию. Детекцию результатов ведут с помощью интеркалирующего красителя SGI.	< 1.10 ⁻²⁰ M

Таблица 1.	3. Примеры	работ по анализу	микроРНК.	описывающих оригинальные	способы получения	аналитического сигнала.
1	· I I .	1 /	1 /	1 1	5	

Буквально в последние годы метод АКК начал применяться для анализа кольцевых РНК, играющих, как и микроРНК, важную роль в регуляции работы генов [Li et al., 2020b]. При обнаружении данного типа мишеней осуществляют ТКК напрямую с образцом РНК, выделенным из биоматериала, поскольку нет необходимости проводить циклизацию НК или вводить ее дополнительно. При проведении ТКК с обратной транскриптазой синтезируются транскрипты, детекция которых возможна либо путем ОТ-ПЦР, либо с помощью гель-электрофореза [Boss, Arenz, 2019].

При разработке новых методов АКК-анализа исследователи не обошли вниманием и CRISPR/Cas-системы редактирования генома [Qiu et al., 2018]. Предложены варианты экспоненциальной АКК, в которых микроРНК выступает праймером для ТКК, приводящей к однонитевой РНК с повторами, расщепляемыми нуклеазой Cas12a, в результате чего генерируются новые праймерные последовательности [Tian et al., 2020а]. CRISPR/Cas-система была применена не только для обнаружения специфических НК-мишеней, но также и для оценки образования неспецифических продуктов АКК за счет использования в качестве внутреннего отрицательного контроля в диагностических тестах-системах [Tian et al., 2020b].

1.2. ОСОБЕННОСТИ КЛЮЧЕВЫХ КОМПОНЕНТОВ АМПЛИФИКАЦИОННЫХ СИСТЕМ

Ключевыми молекулярными компонентами реакций амплификации НК являются анализируемые НК, полимеразы и праймеры. От правильности их выбора и от их состояния зависит результативность реакций амплификации.

1.2.1. Фрагментация нуклеиновых кислот

Рост интереса к исследованию биологических объектов, содержащих разрушенные НК, обусловлено в том числе появлением новых технологий, позволяющих анализировать их с высокой точностью. Известно, что препараты разрушенной ДНК содержат молекулы разной длины, зачастую с химическими модификациями. Если не принимать во внимание химические изменения, можно считать, что образцы разрушенной ДНК представлены короткими фрагментами (от нескольких десятков до нескольких сотен пар нуклеотидов).

В целом, под расщеплением, или фрагментацией ДНК подразумевается возникновение двуцепочечных разрывов в последовательности двойной спирали. Разрывы могут образоваться как между смежными нуклеотидами в обеих цепях с образованием тупых концов, так и на отдалении в несколько нуклеотидов на разных цепях с формированием липких концов. Характер фрагментации ДНК определяется природой разрушающей силы (физическое или химическое воздействие), продолжительностью и интенсивностью воздействия, последовательностью нуклеотидов, наличием тех или иных химических веществ в окружении, влияющих на её структуру [Poinar et al. 1996; Hofreiter et al., 2001; Dabney et al., 2013а]. Короткоцепочечная ДНК (кцДНК) встречается повсеместно, ее источником являются любые материалы биологического происхождения. Практический интерес представляет ДНК из криминалистических, археологических, палеонтологических образцов и объектов окружающей среды. Циркулирующая в кровотоке и других жидкостях внеклеточная ДНК (вкДНК) также представлена короткими нуклеотидными последовательностями.

При работе с разрушенной ДНК возникает ряд сложностей, обусловленных ее фрагментированностью, зачастую малым количеством (низкой копийностью), химической модификацией азотистых оснований, наличием фоновой ДНК и сопутствующих веществ, экстрагирующихся совместно с ней при выделении и затрудняющих проведение анализа. Всё вышеуказанное обусловливает поиск новых приемов и разработку нетривиальных способов исследования разрушенной ДНК.

1.2.1.1. Разрушение ДНК в естественных условиях

Разрушение молекул НК – естественный процесс, происходящий в любом организме как в ходе жизнедеятельности, так и после смерти. Как и другие биополимеры, ДНК способна подвергаться естественной деградации, которая протекает под действием нуклеаз. В клетках молекулы ДНК постоянно подвержены химическим воздействиям, а их целостность контролируется с помощью механизма репарации [Lindahl, 1993]. Остановка репарации после смерти организма является одной из весомых причин высокой фрагментированности древней ДНК и наличия повреждений в ее уцелевших последовательностях [Dabney et al., 2013а]. После смерти организма ДНК подвергается действию не только биологических факторов, но также физических (температура, излучения) и химических (рН, соли, влажность, кислород). Частота некоторых постмортальных повреждений уменьшается за счет замедления или ингибирования активности нуклеаз в организмах, законсервированных в холодных условиях. Тем не менее, полное предотвращение воздействия факторов окружающей среды невозможно.

Факторы с гидролитическим характером действия вызывают разрывы Nгликозидных связей между азотистыми основаниями и дезоксирибозой [Lindahl, Nyberg, 1972; Lindahl, Andersson, 1972]. Расщепление N-гликозидной связи приводит к

образованию бреши и разрыву цепи. Другими типами повреждений являются дезаминирование и окисление азотистых оснований [Poinar et al., 2006]. Степень повреждения молекул ДНК во многом зависит от образца и связана с условиями хранения [Hoss et al., 1996]. Холодные, сухие места со стабильной температурой (например, районы вечной мерзлоты и пещеры) обеспечивают получение хорошо сохранившихся образцов древней ДНК (дДНК), что позволяет проводить масштабные популяционные исследования [Shapiro et al., 2004; Rohland et al., 2005; Campos et al., 2010]. Неблагоприятные условия окружающей среды, такие как высокие влажность и температура, засоленность и кислая среда в значительной степени сказываются на сохранности молекул ДНК. Было подсчитано, что период полураспада фрагмента митохондриальной ДНК длиной 242 пар оснований, выделенной из птичьих костей, составляет около 500 лет, а хранение в замороженном состоянии позволяет сохраниться ей в течение миллионов лет [Allentoft et al., 2012].

Другим типом ДНК, фрагментированной в естественных условиях, является циркулирующая в кровотоке и других биологических жидкостях вкДНК. Существует несколько гипотез ее происхождения: за счет экскреции экстрахромосомной ДНК лимфоцитами [Rogers, 1976], разрушения малых (от 150 п.о. до 20 т.п.о.) гетерогенных кольцевых ДНК [Белохвостов, 1997]. Происхождение низкомолекулярных линейных вкДНК, обнаруживающихся непосредственно в плазме крови при различных патологиях связано, вероятно, с внутриядерной деградацией ДНК вследствие активации ядерных нуклеаз [Cohen, Duke, 1984; Sellins, Cohen, 1987] или вследствие нуклеазной активности антител, связывающихся с ДНК в крови [Stroun et al., 1987]. Предполагалось, что вкДНК может быть синтезирована микроорганизмами, присутствующими в крови [Stroun et al., 1989].

Амплификация разрушенной ДНК открывает новые возможности в некоторых областях знания. Например, в молекулярной археологии она помогает ответить на вопросы эволюции живого мира за счет частичного восстановления генетической информации вымерших видов животных и растений, находит применение при исследовании динамики частот генов в популяциях [Erickson et al., 2005; Dabney et al., 2013b; Orlando et al., 2013]. Методы высокопроизводительного секвенирования позволили лучше понять характер фрагментации ДНК благодаря локализации разрывов цепей, которые правильно определяются при условии, что терминальные нуклеотиды не удаляются в ходе ферментативных обработок, используемых во время подготовки библиотек. Так, при использовании этого подхода было показано, что пурины в больших количествах представлены на 5'-концах фрагментов ДНК, выделенных из останков неандертальцев,

мамонтов и пещерных медведей, живших 40000 лет назад [Briggs et al., 2007; Orlando et al., 2011; Overballe-Petersen et al., 2012]. Были просеквенированы целиком митохондриальные геномы неопознанных жертв Второй мировой войны и археологических останков 2500-летней давности [Templeton et al., 2013]. Описан метод miPCR, позволяющий эффективно амплифицировать фланкирующие фрагменты геномной ДНК с неизвестной последовательностью [Pogorelko, Fursova, 2008].

Усовершенствован вариант широко используемой методики экстракции ДНК на основе диоксида кремния [Rohland, Hofreiter, 2007b], которая в сочетании с методом подготовки библиотек одноцепочечных ДНК позволяет секвенировать короткие, до 30 ДНК. Возможности данной методики продемонстрированы п.о., молекулы с использованием ДНК, выделенной из кости пещерного медведя среднего плейстоцена [Dabney et al., 2013b]. Несмотря на то, что большая часть ДНК пещерных медведей была представлена фрагментами длиной всего лишь 30-50 п.о., авторы данной работы считают, что еще не найден нижний предел размеров фрагментов ДНК, который в будущем может быть доступным для секвенирования с использованием библиотеки на основе разработанной ими методики [Orlando et al., 2011, 2013, Dabney et al., 2013b].

1.2.1.2. Искусственная фрагментация ДНК

Искусственная фрагментация ДНК нашла применение в современных методах исследования генома. Ее осуществляют разными способами в зависимости от целей дальнейших манипуляций. Известны фрагментация посредством действия физических факторов или химических/биохимических агентов. Предложен также "синтетический" способ фрагментации с помощью ПЦР-амплификации. Искусственная фрагментация используется в технологиях секвенирования нового поколения [Ansorge, 2009; Mardis, 2013] и ДНК-микрочипов [Mann, Krull, 2004]. Исследуемая ДНК перед лигированием с адаптерными последовательностями (в технологии NGS) или перед гибридизацией с зондами на поверхности биочипа (в технологии ДНК-микрочипов) предварительно расщепляется на фрагменты определенной длины. На сегодняшний день для разрушения ДНК применяют в основном ферментативное или механическое воздействие [Adey et al., 2010; Hiatt et al., 2010; Burton et al., 2014; Snyder et al., 2015].

Для фрагментации ДНК ферментами применяют неспецифичные и специфичные эндонуклеазы. Первые обеспечивают образование фрагментов случайной длины и состава, в то время как вторые приводят к набору продуктов с известными нуклеотидными последовательностями. При подготовке библиотек для секвенирования часто используются мелкощепящие неспецифичные рестриктазы, например, ColE7 и Vvn,

сочетание которых легло в основу ферментного комплекса dsDNA Fragmentase [de Sousa Dias et al., 2013; Clarke et al., 2014]. Отечественными авторами предложен метод ПЦРфрагментации, позволяющий анализировать ДНК с крайне малым стартовым количеством [Zheleznaya et al., 1999]

НК способны расщепляться под действием химических агентов, что стало основой метода секвенирования, предложенного Максамом и Гилбертом [Maxam, Gilbert, 1977]. Позднее были разработаны варианты специфичного расщепления ДНК по пуриновым и пиримидиновым основаниям [Maxam, Gilbert, 1980; Rubin, Schmid, 1980; Свердлов, 1983; Richterich Калинина, McCarthy, 1989; et al., 1995]. Negri с соавт. продемонстрировали способ одноэтапного расщепления НК по всем четырем основаниям с использованием N-метилформамида в присутствии ионов марганца [Negri et al., 1996]. Описан способ химической фрагментации ДНК с помощью реагента Fe-ЭДТА, который генерирует свободные гидроксильные радикалы по реакции Фентона, эффективно расщепляющие ДНК путем взаимодействия с азотистыми основаниями [Gyarmati et al., 2013]. Метод был использован для подготовки библиотек для секвенирования и обеспечил получение фрагментов ДНК нужной длины (100-300 п.о.).

На сегодняшний день описано несколько способов механической фрагментации ДНК. Главной причиной механического разрушения молекул ДНК в водном растворе является гидродинамический удар, который может возникнуть вследствие процессов, ведущих к локальным перепадам давления в жидкости из-за изменений скоростей ее потока. Еще в 1962 г. был описан способ фрагментации ДНК с использованием медицинского шприца [Freifelder, Davison, 1962]. Он стал основой для создания "гидроножниц" (Hydroshear), с помощью которых можно получить фрагменты длиной 1,5-8 Кб с минимальной потерей образца [Oefner et al., 1996; Thorstenson et al., 1998]. Относительно недавно были предложены способы фрагментации ДНК в малых объемах (менее 10 мкл) в микрофлюидных чипах [Shui et al., 2011; Tseng et al., 2012; Okabe, Lee, 2014].

Способ фрагментации ДНК посредством небулизации также использует принцип гидродинамического удара, возникающего за счет продавливания раствора ДНК через узкий канал под высоким давлением, что приводит к резкому увеличению скорости движения жидкости, а при выходе во внутреннее пространство устройства – превращению в аэрозоль [Lentz et al., 2005]. Небулайзеры Life Tech (Grand Island) фрагментируют ДНК до размеров в 100-3000 п.о. за секунды. Метод не требует больших количеств ДНК-материала, доступен и прост в исполнении [Sambrook, Russell, 2006а]. К его недостаткам можно отнести большие потери ДНК (до 30%) во время образования тумана.

Небулизация впервые была использована для подготовки ДНК-библиотек для секвенирования в приборах Roche 454 и Illumina, но стала менее популярной с появлением приборов с адаптивной сфокусированной акустической системой.

В настоящее время для фрагментации ДНК наиболее часто применяют ультразвуковое (УЗ) облучение, впервые использованное для этой цели еще в конце 1950-х гг. [Cavalieri, Rosenberg, 1959]. В данном случае гидродинамический удар возникает вследствие акустической кавитации [Suslick, Price, 1999; Lee et al., 2005]. Пузырьки газа образуются при прохождении звуковых волн большой интенсивности [Fuciarelli et al., 1995; Miller, Thomas, 1996] и в основном около микропримесей, в качестве которых могут выступать и молекулы ДНК [Lentz et al., 2006]. В момент схлопывания внутри кавитационных пузырьков развиваются высокие температура и давление [Didenko et al., 1999; McNamara et al., 1999], скорости микропотоков воды могут достигать 700 м/с [Suslick, Price, 1999]. Воздействие на молекулу ДНК микропотока воды с такой скоростью даже в течение около десяти пикосекунд окажется достаточным для разрыва фосфодиэфирной связи [Pan, MacKerell, 2003; Kalodimos et al., 2004]. Для фрагментации ДНК под действием УЗ были созданы специальные устройства, например, Covaris (дает фрагменты размером 100-5000 п.о.) и Bioruptor (дает фрагменты размером 150-1000 п.о.).

1.2.1.3. Свойства молекул ДНК, влияющие на фрагментацию

До недавних пор считалось, что фрагментация ДНК под действием физических факторов носит случайный характер, однако появились данные, опровергшие это представление. Оказалось, что определенные нуклеотидные сайты предрасположены к разрушению в большей степени в силу своих локальных структурно-динамических свойств [Гроховский, 2006; Гроховский и др., 2008; Nechipurenko, Golovkin, 2009; Grokhovsky et al., 2011]. Гроховский С.Л. и соавт. выделяли два фактора, влияющих на вероятность разрыва цепи ДНК в конкретном ее участке. Один из них – структурный – обусловлен конформационными свойствами дцДНК, которые на всем протяжении молекулы не однородны из-за гетерогенности последовательности нуклеотидов. Выявлено также резкое уменьшение вероятности разрыва в концевых участках ДНК, т.н. эффект "нещепления концов", который связан со снятием напряжения вдоль двойной спирали на концах [Головкин и др., 2009]. Таким образом, конформационные и динамические свойства ДНК-цепей определяют специфическую картину расщепления для каждого конкретного участка ДНК.

Частота разрывов межнуклеотидных связей зависит от типа образующих их нуклеотидов и от их ближайших соседей. Частота расщепления динуклеотидов 5'-CG-3' и

5'-СА-3', отличающихся по своей локальной пространственной структуре от канонической, заметно превышает фоновый уровень [Poptsova et al., 2014]. Ранее были получены данные, свидетельствующие 0 существенном отличии состояния конформационного равновесия динуклеотидов 5'-CG-3' от 5'-GC-3' [Neumann et al, 1979]. Динуклеотид 5'-CG-3' характеризуется еще и тем, что обладает наибольшими значениями энтальпии и энтропии по сравнению с остальными динуклеотидами [SantaLucia, 1998]. Еще одна важная особенность 5'-CG-3' – её максимальная анизотропия гибкости [Packer, 2000а, 2000b], т.е., если для относительного сдвига пар нуклеотидов вдоль длинной оси не требуется большая энергия, то для осуществления подобного сдвига вдоль короткий оси необходимо значительное напряжение. Для динуклеотида 5'-CG-3' значимым является влияние соседних нуклеотидов. Так, расщепление чаще происходит по сайтам 5'-CCGC-3' и 5'-GCGA-3', а для 5'-GA-3' – в составе тетрануклеотидов 5'-CGAC-3' и 5'-GGAA-3' [Гроховский и др., 2008].

Необходимо отметить, что помимо указанных выше структурных особенностей, влияющих на "ломкость" молекул дцДНК в тех или иных точках, существует еще один определяющий фактор – персистентная длина, являющийся мерой расстояния, на котором цепь "сохраняет" то направление, которое задает первая связь. Иными словами, персистентная длина – это расстояние вдоль контура цепи, на котором сохраняется корреляция между направлениями элементарных звеньев. Персистентная длина тесно связана с "жесткостью" цепи и является ключевым параметром для количественной интерпретации конформационных свойств молекул ДНК [Geggier, Vologodskii, 2010]. Персистентная длина дцДНК составляет в физиологическом растворе около 50 нм, что соответствует примерно 160 п.о. [Hagerman, 1981; Wiggins et al., 2006]. Было показано, что персистентная длина не зависит существенно от последовательности нуклеотидов [Widom, 2001; Travers, 2004]. Достоверное знание этой величины важно для анализов многих биологических процессов, включающих как взаимодействие двух и более сайтов ДНК, так и взаимодействие ДНК с белками [Vologodskaia, Vologodskii, 2002].

1.2.2. Неспецифическая активность ДНК-полимераз

Главными компонентами амплификационных систем, во многом определяющими их специфичность и чувствительность, являются полимераза и НК-матрица. От их состояния (актуально для НК) и особенностей структуры и свойств (актуально для полимераз) зависит успешность амплификации. Как правило, для амплификации НК *in vitro* применяются ДНК-полимеразы бактериального или вирусного происхождения

[McInerney et al., 2014; Zhang et al., 2015]. Среди бактериальных организмов-источников полимераз можно выделить четыре рода – Escherichia, Thermus, Bacillus и Geobacillus. Одной из первых охарактеризованных полимераз стал большой фрагмент ДНКполимеразы I из Escherichia coli (фрагмент Клёнова), но низкий температурный оптимум активности ограничивает ее применение. Первым термостабильным ферментом стала Таqполимераза, открытие которой способствовало бурному развитию ПЦР. Таq-полимераза является наиболее используемым ферментом при амплификации ДНК. Обладающая сходными с Таq-полимеразой характеристиками Tth-полимераза сохраняет активность при более высоких концентрациях различных ингибиторов [Al-Soud, Rådström, 2001], что позволяет использовать её при амплификации ДНК из сложных объектов. ДНКполимеразы родов Bacillus и Geobacillus (полимеразы Bsu из Bacillus subtilis, Bsm из Bacillus smithii, Bst из Geobacillus stearothermophilus) обладают меньшей устойчивостью к высоким температурам, чем полимеразы архей или рода *Thermus*. Однако оптимум активности двух последних полимераз (60-65°С) близок к наиболее задаваемой температуре отжига праймеров, а отсутствие экзонуклеазной и наличие цепьвытесняющей активности обеспечивает их применимость для проведения изотермической амплификации.

Наиболее используемыми полимеразами, выделенными из архей, являются Pfu (из *Pyrococcus furiosus* [Lundberg et al., 1991]), Deep Vent (из *Pyrococcus sp.* (штамм GB-D) [Terpe, 2014]) и Pwo (из *Pyrococcus woesei* [Dabrowski, Kur, 1998]). Большой интерес представляют гипертермофильные археи рода *Thermococcus*, живущие при температурах выше 80°C. Коммерчески доступны полимеразы Tli (также известная как Vent) из *Thermococcus litoralis* [Neuner et al., 1990], Tgo из *Thermococcus gorgonarius* [Miroshnichenko et al., 1998], Tfu из *Thermococcus funicolans*, 9°Nm из *Thermococcus sp.* [Greenough et al., 2014]. Для амплификации повреждённой ДНК рекомендуют использовать полимеразу из *Sulfolobus islandicus* [Lipps et al., 2003].

В последние 10-15 лет все активнее используются ДНК-полимеразы вирусного происхождения, например ДНК-полимераза бактериофага phi29, способная синтезировать ДНК длиной свыше 70 т.п.о. Возможность амплифицировать протяжённые участки делает phi29 одним из самых востребованных ферментов для полногеномной амплификации [Paez et al., 2004]. Димерная ДНК-полимераза фага T7 имеет, помимо полимеразной, ещё и 3'-5'-экзонуклеазную активность [Engler et al., 1983]. Включение в состав Таq-полимеразы тиоредоксин-связывающего домена ДНК-полимеразы фага T3 повысило процессивность фермента в 20-50 раз [Davidson et al., 2003]. Скрининг вирусного метагенома из горячих источников Йеллоустоуна позволил выявить и охарактеризовать термостабильную ДНК-

полимеразу PyroPhage 3173 (коммерческий продукт OmniAmp), имеющую повышенную термостабильность с оптимумом около 70°С, обладающую ревертазной активностью [Chander et al., 2014]. Еще одной полимеразой, нашедшей применение в LAMP, является фермент SD, представляющий собой измененную Taq-полимеразу, которой придана сильная цепь-вытесняющая активность [Ignatov et al., 2014].

Методы изотермической амплификации требуют использования полимераз с цепьвытесняющей активностью (цв-ДНК-пол), способных обеспечить расхождение цепей НК при постоянной температуре. Таковыми являются фрагмент Кленова, phi29, Vent exo⁻, Bst exo⁻ и др. ДНК-полимераза phi29 обладает чрезвычайно высокой процессивностью, однако имеет слишком низкие оптимум активности и температуру инактивации (30 и 65°C соответственно). Vent exo- термостабильна, имеет высокий температурный максимум активности (75°C) и обладает процессивностью, сравнимой с ДНК-полимеразой Таq. Большой фрагмент ДНК-полимеразы I из *Geobacillus stearothermophilus*, или Bst exo-, является относительно термостабильным (температурный оптимум - 60-65°C) и процессивным ферментом. РНК-полимераза бактериофага T7 применяется для проведения ТКК, однако требует наличия промоторных последовательностей или матрицы с повышенным содержанием пиримидиновых оснований.

Полимеразы не являются абсолютно точным молекулярным инструментом, что приводит к ошибкам при репликации и транскрипции как *in vivo*, так и в реакциях амплификации in vitro. Даже улучшенные и созданные генно-инженерным путем полимеразы не лишены ряда недостатков. Иногда после начала широкого использования фермента у него выявляются неожиданные свойства, о которых производитель не сообщал. Например, HemoKlenTaq позиционируется как полимераза для ПЦРамплификации, однако у данного фермента нет 5'- и 3'-экзонуклеазных активностей, поэтому можно предположить наличие у него еще и цепь-вытесняющей активности. Другой пример – ДНК-полимераза 9°Nm – производилась всего лишь около 4 лет и была способности снята с производства, по-видимому, из-за эффективно вести неспецифический ДНК-синтез. В результате компания-производитель заменила данный свой продукт на рекомбинантый фермент Therminator.

Ранее неоднократно была показана способность некоторых термостабильных ДНКполимераз, например, Taq и Tth, осуществлять синтез ДНК *ab initio*, т.е. в отсутствие матриц и даже праймеров при наличии только трифосфатов. Было показано, что при этом образуются фрагменты ДНК разной длины, содержащие преимущественно нуклеотиды A или T [Ogata, Miura, 1997, 1998a, 1998b]. Было обнаружено, что ДНК-полимераза Bst ехо часто приводит к образованию неспецифичных продуктов [Zyrina et al., 2014]. Еще в 2001

г. было показано, что при использовании линейной матрицы и двух праймеров к ней происходит мультимеризация линейной матрицы, заключающаяся в образовании набора продуктов, представляющих собой тандемно расположенные повторы нуклеотидной последовательности матрицы [Hafner et al., 2001]. Недавно была предложена гипотеза, объясняющая мультимеризацию ДНК под действием полимеразы Bst [Wang et al., 2017]. Авторами на модельной системе, состоящей из короткой линейной одноцепочечной ДНК (олигонуклеотид) и одного праймера, показано, что после отжига и элонгации праймера свободный З'-конец линейной матрицы загибается и отжигается ближе к 5'-концевому участку матрицы, образуя псевдоциклическую ДНК-структуру. Имеются данные о том, что неспецифическая амплификация ДНК под действием полимеразы Bst является контекстно-зависимой [Qian et al., 2012]. Протекание нежелательного ДНК-синтеза снижает специфичность и чувствительность обнаружения мишени, а также эффективность амплификации из-за конкуренции за реагенты между специфической и неспецифической реакциями синтеза ДНК. Одно из недавних исследований описывает способ дифференциации специфических и неспецифических результатов изотермической амплификации с полимеразой Bst exo- посредством цифровой LAMP [Rolando et al., 2020].

Считается, что полимеразам нужны два [Steitz, 1998] или три [Yang et al., 2016] катиона двухвалентных металлов для переноса нуклеотидов. Широко признан двухкатионный механизм [Tsai, 2019]. Несмотря на то, что Mg^{2+} является наиболее подходящим и универсальным кофактором, полимеразы также могут использовать и другие катионы в процессе репликации, однако скорость и точность встраивания нуклеотидов в этом случае снижаются; кроме того, может проявиться несвойственная полимеразе активность [Vashishtha et al., 2016]. Хотя Mn^{2+} оказывает высокий мутагенный эффект за счет ошибочного встраивания нуклеотидов, его часто применяют для усиления ревертазной активности полимераз, например, ДНК-полимеразы Tth [Myers, Gerald, 1991]). Считается, что Dpo4 и PabPoIB – единственные полимеразы, активируемые ионами Ca²⁺ [Irimia et al., 2006; Ralec et al., 2017]. Полноразмерная полимераза Bst способна активироваться в присутствии Mn^{2+} , Co²⁺ и Cd²⁺ [Vashishtha, Konigsberg, 2018].

1.2.3. Требования к дизайну праймеров

Праймеры являются незаменимой составляющей любой амплификационной системы. Поскольку при проведении молекулярной диагностики выявляют специфичную НК-мишень, праймеры подбирают с учетом необходимости ее обнаружения с максимальной достоверностью. Им принадлежит ключевая роль в определении

специфичности, чувствительности и эффективности амплификации, поэтому многие способы обнаружения НК основаны на изменении качественных и/или количественных характеристик праймеров.

Дизайну праймеров методических посвящено немало руководств И экспериментальных статей (например, [Noguera et al., 2014; Feeney et al., 2014]). Часто в них можно встретить противоположные мнения относительно критериев подбора праймеров, что подчеркивает отсутствие единого подхода к выбору праймерных последовательностей. Главным требованием, предьявляемым к праймерам, является обеспечение высокой специфичности и чувствительности амплификации. Но если специфичность действительно в значительной степени определяется праймерами, то на эффективность более сильное влияние оказывают прочие факторы. Специфичность амплификации во многом зависит от длины праймеров и последовательности нуклеотидов в них [Wu et al., 1991]. Считается, что для сведения к минимуму неспецифической амплификации необходимо, чтобы праймеры обеспечивали большую прочность связывания с матрицей на 5'-, нежели на 3'-концах [Rychlik, 1993]. Протяженные олигоdG или олиго-dC участки будут способствовать неспецифическому отжигу, тогда как олиго-dA и олиго-dT участки приведут к снижению температуры отжига праймеров и, как следствие, эффективности амплификации. Прочность связывания праймера с матрицей также снижается образовании вторичных структур (например, при шпилек) последовательностью как мишени, так и самого праймера.

3'-Концы праймеров ответственны как за истинное, так и за фальш-праймирование. Имеются конкретные рекомендации по выбору нуклеотидов или их последовательностей на 3'-конце и в прилегающей области. Так, анализ всех 64 возможных триплетов, находящихся на 3'-концах 2137 праймеров из базы данных VirOligo, позволил определить AGG как наиболее "популярную" последовательность, встречавшуюся в праймерах в 8 раз чаще, чем TTA [Onodera, Melcher, 2004; Onodera, 2007]. Считается, что праймеры не должны содержать динуклеотиды GC или CG на 3'-конце, поскольку они приводят к образованию относительно прочных, способных к удлинению димерных структур [Mitsuhashi, 1996]. Однако праймеры с АТ-богатыми подпоследовательностями на 3'концах не столь эффективно инициируют синтез ДНК, поэтому должен соблюдаться определенный баланс между эффективностью праймирования и неспецифичным отжигом [Miura et al., 2005].

Плохо подобранные праймеры (праймеры "низкого" качества) могут привести к малому выходу целевого продукта из-за протекания побочной (неспецифической) амплификации за счет образования димеров праймеров (ПД). Необходимым критерием

качества праймеров является отсутствие внутренней гомологии в последовательности праймера, приводящей к гомодимерам, и гомологии между прямым и обратным праймерами, приводящей к гетеродимерам. Потенциальное количество возможных типов ПД зависит от количества используемых праймеров и подчиняется формуле $2n^2 + n$, где n – число пар праймеров. Таким образом, для двухпраймерной ПЦР максимальное число ПД составит 3, два из которых принадлежат гомодимерам прямого и обратного праймеров, а один – гетеродимеру. В случае мультиплексной ПЦР количество потенциальных ПД растет с катастрофической быстротой. Результатом образования ПД любой природы может оказаться заметное снижение эффективности наработки целевого ампликона (вплоть до невозможности амплификации мишени) в силу предпочтительности амплификации димерных структур. В ОТ-ПЦР остаточная ревертазная активность обеспечивает удлинение ПД, с большей вероятностью возникающих при низкой температуре [Chumakov, 1994; Vandesompele et al., 2002].

Предложено несколько подходов для исключения димеризации праймеров. Самым действенным способом считается применение так называемого "горячего старта", когда амплификация начинается при температуре, при которой возможные ПД неустойчивы [Paul et al., 2010; Green, Sambrook, 2018]. Предложенный первым вариант обеспечения "горячего старта" подразумевал физическое разделение компонентов реакционной смеси до начала реакции [Chou et al., 1992]. Впоследствии были разработаны иные стратегии обеспечения "горячего старта": использование термоактивируемых ДНК-полимераз [Birch et al., 1996; Kermekchiev et al., 2003], праймеров [Lebedev et al., 2008; Ashrafi, Paul, 2009] и дНТФ [Le, Paul, 2009]. Еще одним вариантом "горячего старта" стало использование специально сконструированных праймеры, на 5'-конец которых был добавлен ряд нуклеотидов, комплементарных 3'-концу и образующих довольно прочную шпильку [Kaboev et al., 2000]. Интересным решением являются так называемые кооперативные праймеры [Satterfield, 2014] и праймеры с 5'-концевыми последовательностями, некомпементарными матрице [Brownie et al., 1997].

Одна из ранних работ по ПЦР была посвящена вопросу достаточности числа спариваемых нуклеотидов в составе праймеров для обеспечения специфичности реакции [Sommer, Tautz, 1989]. Ayyadevara et al. показали, что большей дискриминирующей способностью (в 40-100 раз) обладают праймеры, в которых на 3'-конце находятся нуклеотиды dT, dG или dC, но не dA [Ayyadevara et al., 2000]. Ими же приводятся данные о том, что от второго нуклеотида с 3'-конца зависит дискриминирующая способность праймеров и эффективность ПЦР, причем если в этом положении находятся dT или особенно dA, эффективность амплификации заметно снижается. Были исследованы все

возможные варианты неспаривания с матрицами З'-концевых нуклеотидов в праймерах на предмет их удлинения ДНК-полимеразой Taq и обнаружено, что варианты транзиций $dA(праймер) \cdot dC, dC \cdot dA, dG \cdot dT$ и dT · dG удлиняются в 10^{-3} - 10^{-4} менее эффективно по сравнению с полностью спаренными каноническими структурами [Huang et al., 1992]. С еще меньшей эффективностью удлиняются праймеры с трансверсиями dT • dC и dT • dT $(10^{-4}-10^{-5})$, трансверсиями dA • dA, dG • dA, dA • dG, dG • dG, dC • dC (<10^{-6}), тогда как трансверсия dC • dT обеспечивала наименьшую дискриминирующую способность (10⁻²). Незначительное влияние на эффективность амплификации оказывало наличие на 3'-конце праймеров некомплементарных пар A|G, G|A, C|C (снижали наработку целевого продукта примерно в 100 раз), A|A (снижало в 20 раз), а два соседних неспаренных TT обеспечили успешное протекание амплификации [Kwok et al., 1990]. Введение неспаренного нуклеотида в положение -3 [Ребриков и др. 2009] или -4 [Lefever et al., 2019] от 3'-конца праймера заметно улучшает эффективность аллель-специфичной ПЦР. Повышение дискриминирующей способности праймеров достигается включением по 3'-концам LNAили ENA-нуклеотидов [Latorra et al., 2003; Koizumi et al., 2005; Nakitandwe et al., 2007], в положении 4-С' – метоксиметиленовой [Strerath et al., 2007; Kranaster, Marx, 2007] или винильной групп [Strerath, Marx, 2002], фосфотиоата [Hu et al., 2007].

При изучении ДНК из ископаемых останков основными ограничениями являются малое количество извлекаемой (эндогенной) ДНК и нарушение целостности полинуклеотидных цепей. Даже несмотря на то, что в некоторых изучавшихся образцах сохранялись достаточно протяженные ДНК (до 1600 п.о.), их амплификация протекала успешно только в отдельных (редких) случаях. При исследовании разрушенной ДНК исследователям приходится оптимизировать протоколы ПЦР, а также с особой тщательностью подходить к вопросу подбора праймеров. Очевидным решением в данном случае является использование максимально сближенных праймеров. Были предложены варианты ПЦР с использованием FRET-эффекта (резонансный перенос энергии флуоресценции), возникающего между праймерами, расположенными "встык" и мечеными донорно-акцепторной парой красителей [Ahmad, Ghasemi, 2007; Chemeris et al., 2012]. Путем наработки небольших перекрывающихся продуктов ПЦР возможно восстановление длинных последовательностей или даже целых митохондриальных геномов. Так, предложен метод мультиплексной ПЦР, позволяющий одновременно извлекать несколько последовательностей из небольшого количества деградированной ДНК. С помощью данного метода (было сконструировано 46 пар перекрывающихся праймеров) восстановлен митохондриальный геном плейстоценового мамонта Mammuthus primigenius из ДНК, выделенной из 200 мг кости [Krause et al., 2006]. Разработана

программа для создания мультиплексных наборов вырожденных праймеров для полногеномного секвенирования геномов вирусных частиц, ДНК которых выделена из "сложных" образцов или имеется в малых количествах на фоне ДНК других организмов [Gardner et al., 2014].

Описан способ обнаружения единичных копий фетальной ДНК в моче беременных женщин с помощью ПЦР и ПЦР-РВ с использованием сближенных праймеров [Shekhtman et al., 2009]. Для типирования низкокопийной ДНК и искусственно разрушенной ДНК разработана методика аллель-специфичной амплификации с использованием репортерных праймеров [Hussain et al., 2003], которая позволила успешно провести SNPгенотипирование сильно деградированной ДНК, выделенной из ткани, хранившейся в формалине 4 года [Asari et al., 2009]. Возможность успешного протекания ПЦРамплификации даже в случае наличия в реакционной смеси некоторого количества химических агентов, таких как формалин и парафин, показана еще одними авторами [Dietrich et al., 2013].

Часто для амплификации применяют химически модифицированные праймеры. Модификации могут располагаться в любом месте цепи и затрагивать азотистые основания, углеводные остатки и фосфатные группы. Одни модификации могут быть внесены только В ходе химического синтеза олигонуклеотидов, другие постсинтетически. Самой простой постсинтетической модификацией праймеров можно считать введение радиоактивного фосфора в ходе ферментативного фосфорилирования [Hayashi et al., 1989]. Достаточно часто используется биотиновая модификация, что находит применение при проведении твердофазной и полуколичественной ПЦР, при секвенировании ДНК [Bengstrom et al., 1991; Landgraf et al., 1991]. В качестве меток в праймеры включают различные флуорофоры, тушители флуоресценции, прочие репортерные группы. Введение некоторых флуорофоров и иных модификаций повышает стабильность ДНК-дуплексов [Moreira et al., 2015]. Однако большинство химических модификаций приводят к ингибированию ферментативных превращений НК, в том числе амплификации [Summerton et al., 1997; Kuznetsov et al., 2017], хотя известны примеры использования полимеразами неприродных НК-субстратов [Higuchi et al., 1990; Froim, et al., 1997; Veedu et al., 2009].

Конструирование и подбор праймеров осуществляют с помощью специальных компьютерных программ, которых на сегодняшний день насчитывается несколько сотен. Мощным программным продуктом является FastPCR [Kalendar et al., 2017], позволяющая осуществлять дизайн праймеров не только для стандартной ПЦР, но и для мультиплексной, вырожденной ПЦР, включая использование LNA-аналогов нуклеотидов,

ПЦР-РВ, LAMP. Другим широко используемым инструментом является программа Primer3 (http://primer3.ut.ee), позволяющая не только подбирать праймеры de novo, в том числе для секвенирования, но и проводить валидацию известных [Koresaar, 2007]. Недавно была написана подпрограмма Primer3 masker, отсекающая повторяющиеся последовательности ДНК в геномах организмов из царств растений и животных [Koressaar, Remm, 2018]. Программа PrimerXL (http://www.primerxl.org), основанная на алгоритме Primer3, включает ряд оптимизированных параметров [Lefever et al., 2017]. Развитием программы MSRE-HTPrimer стал MSP-HTPrimer, предназначенный для дизайна праймеров для анализа метилирования ДНК (https://sourceforge.net/projects/msphtprimer/ [Pandey et al., 2016]). С целью подбора праймеров для метабисульфитной ПЦР, метабисульфитного секвенирования и метилчувствительного высокоточного плавления ампликонов разработаны Softepigen (www.soft-epigen.com) [Pinzon et al., 2018], MethyMer (https://sourceforge.net/projects/methymer/) [Krasnov al., 2018]. CpGPNP et http://forensicdna.kr/cpgpnp/) [Park et al., 2018], PrimerSuite (www.primer-suite.com) [Lu et al., 2017b]. Последняя программа содержит несколько подпрограмм: PrimerDimer, PrimerROC и PrimerPlex [Johnston et al., 2019]. Разработано многофункциональное ПО ThermoAlign (https://github.com/drmaize/ThermoAlign), обеспечивающее дизайн праймеров для ресеквенирования ампликонов [Francis et al., 2017]. Популярность мультиплексной ПЦР обусловила создание программы Oli2go (http://oli2go.ait.ac.at) [Hendling et al., 2018]. Программа STITCHER, предназначенная для подбора перекрывающихся 5'-концами ПЦРпраймеров, доступна на сайте http://ohalloranlab.net/STITCHER_2_0/index.html [O'Halloran et al., 2017]. Primer Spanner (http://ps.biocloud.org.cn) обеспечивает подбор праймеров для сайт-направленного мутагенеза в режиме получения как единичных, так и множественных мутаций [Hou et al., 2018].

В связи с возрастающим интересом к обнаружению и определению РНК-мишеней предложены более узкоспециализированные программные средства. Так, для подбора праймеров для амплификации микроРНК написана miPrimer [Kang et al., 2018]. В базе данных sRNAPrimerDB (www.srnaprimerdb.com) содержится информация о более чем трех миллионах праймеров, предназначенных для детекции малых некодирующих РНК различных организмов [Xie et al., 2018]. Еще одна база данных, MRPrimer (http://mrprimerv.com), содержит пары праймеров, подобранных для амплификации более 7000 кодирующих участков у более чем 1800 различных вирусов. Программа MIPE (MIcrobiota metagenome Primer Explorer) (https://github.com/zoubinok/MIPE) ориентирована на дизайн SSU праймеров для амплификации генов малой рРНК при метагеномных исследованиях [Zou et al., 2017].

В отличие от ПЦР, для подбора LAMP-праймеров предложено менее дюжины компьютерных программ. Среди них наиболее популярными являются бесплатно доступные NEB LAMP Primer Design (https://lamp.neb.com/#!/) и PrimerExplorer (http://primerexplorer.jp/lampv5e/index.html). Данные программы позволяют обрабатывать нуклеотидные последовательности длиной только до 2000 нт. Особая конструкция праймерной системы, небольшое количество программ и требование высокой специфичности делают разработку праймеров для LAMP-амплификации нетривиальной задачей.

1.3. НЕКОТОРЫЕ ПРОБЛЕМНЫЕ АСПЕКТЫ АМПЛИФИКАЦИОННОГО АНАЛИЗА

Успешность протекания реакций амплилифкации НК определяется состоянием и чистотой анализируемой НК, характеристиками используемого фермента, качеством подбора праймеров. Если выбор последних двух компонентов амплификационной системы зависит от квалификации исследователя, то в случае анализируемой НК ему приходится работать с имеющимся материалом.

1.3.1. Выделение короткоцепочечных НК

Помимо небольшого размера, методические трудности при работе с кцНК связаны в том числе с их выделением. Не любой, даже качественный и хорошо сохранившийся биоматериал является источником кцНК, пригодных для успешной амплификации. Выбор способа выделения кцДНК и последующих манипуляций с ней определяется спецификой объекта. Так, ископаемые останки содержат разрушенную ДНК. ДНК из некоторых криминалистических образцов выделяется в малом количестве. ДНК из объектов окружающей среды (из почвы, сточных вод и т.д.) характеризуется преобладанием в них фоновой ДНК. На первый взгляд, при современном уровне развития материальной базы выделение НК в относительно чистом виде не должно вызывать затруднений. Однако извлечение НК из природных или техногенных объектов заметно отличается от такового для рутинных лабораторных образцов.

НК могут иметь разное происхождение (вирусное, бактериальное, протозойное, грибное, растительное, животное), а образцы, из которых их предстоит выделить, существенно различаться. Дополнительные требования к качеству извлечения НК обусловлены высокой чувствительностью методов амплификации, для которых

необходимо полное исключение перекрестного загрязнения образцов. Вследствие этого прослеживается общая тенденция, направленная на максимальное упрощение методов выделения НК, но обеспечивающих при этом нативность и чистоту получаемых препаратов. Важным моментом, который нужно учитывать во время пробоподготовки, является параллельная (одновременная) экстракция НК из большого числа образцов. На сегодняшний день предложены различные способы выделения и очистки НК, которые в простом приближении можно разделить на экстракцию в растворе и на твердофазную экстракцию. При проведении последней используются частицы силикагеля или магнитные частицы, покрытые соответствующими функциональными группами. Такой вариант извлечения НК максимально удобен при автоматизированном выделении НК.

В ранних исследованиях для выделения дДНК использовали мягкие ткани, однако после того, как в 1989 году впервые была выделена дДНК из костей, оказалось, что в среднем в них содержится даже больше ДНК [Paabo, 1989]. В 1998 г. был открыт другой материал для извлечения дДНК – копролит (субфоссильные фекалии), который часто встречается в пещерах засушливых регионов. С тех пор разнообразие источников дДНК увеличивалось: она была успешно выделена из волос (2001 г.), почвенных отложений (2003 г.), перьев (2009 г.), яичной скорлупы (2010 г.) [Hofreiter, Shapiro, 2012].

В экспертно-криминалистических центрах одними из первых стали использоваться методы экстракции ДНК путем кипячения образцов в присутствии анионного сорбента, с использованием центрифужных концентраторов со встроенной ультрафильтрационной мембраной, стеклянных микроволокон в сочетании с фильтровальной бумагой и стеклянных частиц в качестве ДНК-сорбирующего материала [Walsh et al., 1991; Comey et al., 1994]. Каждый из них имеет как преимущества, так и недостатки. В последнее время все большую популярность приобретают молекулярные сита с различным размером пор, способные очищать ДНК от посторонних примесей. Их немаловажной характеристикой является способность удерживать короткие фрагменты ДНК.

Отдельного внимания заслуживают методы экстракции ДНК из растительных объектов ввиду особенностей строения и состава растительных клеток (наличие плотной целлюлозной клеточной стенки, высокое содержание запасных веществ и вторичных метаболитов). Запасные вещества, такие как полисахариды, алкалоиды, фенольные соединения не только осложняют получение чистых ДНК-препаратов. Некоторые из них способствуют изменению химической структуры молекул НК вследствие окислительных процессов. Различия в количественном содержании тех или иных запасных веществ затрудняет выбор метода выделения даже в пределах одного рода растений. В силу специфики выделения растительной ДНК большое внимание уделяется удалению

запасных веществ и вторичных метаболитов – сильнейших ингибиторов ПЦР. В этих целях часто используют кремнеземные матрицы, которые связывают ДНК в присутствии высоких концентраций хаотропных агентов, однако они не применимы для очистки кцДНК (менее 50 п.о.), так как фрагменты такого размера прочно связываются с матрицей и не осаждаются этанолом.

Для выделения ДНК из растений используют различные методы. Довольно широко распространен метод экстракции с применением бромида цетилтриметиламмония [Murray, Thompson, 1980; Doyle, 1987; Demeke, Jenkins, 2010]. Наиболее простым способом решения проблемы при высоких содержаниях полисахаридов, полифенолов и других метаболитов является отбор для выделения ДНК молодых органов растений. Для выделения ДНК суккулентных видов растений, содержащих огромное количество слизеобразных веществ (желирующих полисахаридов), которые трудно отделяются от модифицированный протокол ЦТАБ-метода, ДНК. разработан основанный на ступенчатом осаждении одного компонента за другим [Barnwell et al., 1998]. Показано, что добавление 40 мМ аскорбиновой кислоты с 2-меркаптоэтанолом предотвращает окисление полифенолов, повышая тем самым качество ДНК [Borse et al., 2011]. Помимо оптимизации протоколов возможно уменьшение стартового количества исходного биоматериала с целью уменьшения количества запасных веществ и вторичных метаболитов. Наиболее привлекательным для выделения растительной ДНК является метод выделения без гомогенизации и центрифугирования [Manen et al., 2005].

1.3.2. Сложности при работе с короткоцепочечными НК

Исследования с использованием кцНК затруднены из-за малой длины аналита, модификации химической структуры, наличия ингибиторов, необходимости выявления мишени в присутствии фона, малой концентрации НК. Считается, что качество ДНК определяет надежность и воспроизводимость результатов амплификации [Bar et al., 2003]. Для обнаружения коротких фрагментов применение большинства имеющихся методов детекции НК невозможно в связи с тем, что такие методы ориентированы на анализ НКобразцов хорошего качества, доступных в достаточном количестве. Так, фДНК часто не обнаруживается в силу того, что в образце нет фрагментов, длина которых достаточна для отжига и элонгации праймеров. Иногда присутствие в реакционной системе коротких фрагментов ДНК, обладающих праймероподобными свойствами, меняет течение ПЦР.

Химические модификации ДНК затрудняют использование многими полимеразами ДНК-цепей в качестве матриц, делая невозможной амплификацию (табл. 1.4). Такие

блокирующие повреждения чаще представлены нуклеотидными модификациями или поперечными сшивками, которые могут образоваться либо между нитями ДНК, либо между ДНК и другими молекулами [Dabney et al., 2013а]. С помощью газовой хроматографии и масс-спектрометрии было показано, что фураноны, фуральдегиды и алкильные пиразины – продукты модификации азотистых оснований, могут продуцировать сшивки между ДНК и белками [Poinar et al., 1996]. Для их удаления используют N-фенацилтиазолинбромид – соединение, расщепляющие эти модификации, хотя оно не всегда приводит к желаемому результату [Rohland, Hofreiter, 2007a; Binladen, Willerslev, 2010].

Тип повреждения	Механизм	Проблема	Способы решения
	возникновения		проблемы
разрыв цепей	воздействие	малое количество	амплификация коротких
	био/химических	целых ДНК-	или перекрывающихся
	агентов и физических	мишеней, малый	фрагментов
	факторов	размер фрагментов	
дезаминирование	гидролиз	ошибочное	многократное выделение/
азотистых		кодирование,	амплификация,
оснований		ведущее к заменам	клонирование,
		оснований	применение УДГ (урацил-
			ДНК-гликозилазы)
модификация	окисление	невозможность	использование
азотистых		амплификации	специальных полимераз,
оснований		(блокировка работы	клонирование
		полимеразы),	
		ошибочное	
		кодирование	
поперечные	воздействие света	невозможность	использование бромида
сшивки		амплификации	N-фенацилтиазолия

Таблица 1.4. Типы повреждений и способы анализа разрушенной ДНК.

При тепловой денатурации ДНК, хранившейся в условиях вечной мерзлоты, поперечные сшивки накапливаются примерно в сто раз быстрее, чем однонитевые разрывы [Hansen et al., 2006]. По результатам амплификации ДНК возрастом 27000-48000 лет, выделенных их трех костей, сохранившихся в условиях вечной мерзлоты, обнаружили присутствие блокирующих повреждений, в том числе поперечных сшивок, не более чем в 40% молекул [Heyn et al., 2010]. При анализе 11 образцов ДНК из объектов, хранившихся в условиях мерзлоты и вне ее, было показано наличие в структуре ДНК 5-гидрокси-5-метилгидантоина и 5-гидроксигидантоина, являющихся продуктами окисления

пиримидинов. Амплификация митохондриальной ДНК из этих образцов оказалась возможной только в пяти случаях – для образцов, содержавших в 3-30 раз меньше гидантоинов, чем образцы, амплифицировать которые не удалось [Hoss et al., 1996].

Довольно распространенной проблемой является неполное удаление или соосаждение других биополимеров (белки и углеводы), образующих с ДНК сложные комплексы, а также красителей, гемина и пр., вызывающих ингибирование ПЦР. Соосаждение ингибиторов ПЦР совместно с ДНК особенно характерно для старых биоматериалов. Это связано с тем, что в большинстве случаев сохранность ДНК обусловлена ее соединением в комплексы с каким-либо веществом, обеспечивающим защиту от разрушающих факторов окружающей среды. Так, выделение ДНК именно из костей древних останков является наиболее результативным, поскольку разрушение кости происходит намного медленнее по сравнению с мягкими тканями. В то же время "связанное" состояние ДНК обусловливает трудоемкость ее выделения.

Сложность работы с ДНК-смесями обусловлена наличием в образцах большого количества чужеродной (фоновой) ДНК, при этом соотношение ДНК-матриц разного происхождения часто неизвестно. Для ПЦР-анализа ДНК-смесей предложено несколько разных подходов, нашедших наибольшее применение в криминалистике ввиду характера биоматериалов, с которыми приходится иметь дело. Методики, используемые в этой области, разработаны, как правило, для анализа STR-локусов [Hedell et al., 2015]. Получаемые результаты часто являются артефактами, возникающими при амплификации низкокопийной ДНК (включение/выпадение аллелей и др.) [Haned et al., 2015]. Серьезную проблему представляют также неспецифические продукты, образующиеся вследствие увеличения количества сайтов отжига праймеров при ко-амплификации большого числа локусов. Неспецифические продукты реакции формируются в то числе и тогда, когда в совместной амплификации участвует небольшое количество локусов, но ДНК в пробе деградирована [Whitaker et al., 1995]. Это объясняется нежелательным влиянием на протекание реакции коротких взаимодополняемых последовательностей фДНК [Gill et al., 1996].

Отдельного внимания в качестве примера кцНК заслуживают микроРНК (миРНК), представляющие собой класс малых некодирующих РНК и играющие ключевую роль в сигнальных путях и реакциях на стресс в живых организмах. Участие миРНК активно изучается в отношении развития патологических состояний человека [Xiao, 2022; Cheong et al., 2022], и уже предложен ряд терапевтических средств на их основе [Momin et al., 2021]. Содержание миРНК в биологических тканях варьирует в наномолярном диапазоне, поэтому для их количественного определения требуется этап амплификации. Однако

зрелые миРНК представляют собой небольшие молекулы, которые затрудняют использование рутинных методов амплификации, таких как классическая ПЦР, поэтому был разработан ряд альтернативных подходов [Chen et al., 2005; Balcells et al., 2011; Yaylak, Akgül, 2022]. Наиболее популярный метод основан на использовании шпилечного праймера [Chen et al., 2005], другой включает удлинение микроРНК путем их полиаденилирования с последующей традиционной ПЦР с 3'-олиго-dT праймером [Balcells et al., 2011]. В последние годы были разработаны биосенсорные технологии для обнаружения миРНК [D'Agata, Spoto, 2019], включая совмещенные с гибридизационной цепной реакцией [Bi et al., 2017] и использованием аптамеров и ДНКзимов [Wang et al., 2022]. Также предложены подходы, основанные на изотермической амплификации и обеспечивающие более высокую достоверность анализа миРНК [Deng et al., 2017; Komori et al., 2019; Gines et al., 2020; Yaylak, Akgül, 2022; Bellassai et al., 2022].

1.3.3. Проблема неспецифической амплификации НК

Практически сразу после появления ПЦР серьезное внимание стало уделяться вопросам достоверности ПЦР-анализа. Для специалистов в области ПЦР частое получение ложноотрицательных или ложноположительных результатов является неудивительным. Первой работой, в которой обращалось внимание на эту проблему, стала статья [Lo et al., 1988]. Следом за ней появились конкретные рекомендации по недопущению загрязнения ПЦР-смеси ампликонами из предыдущих реакций [Kwok, Higuchi, 1989]. В качестве одного из способов исключения контаминации ампликонами рекомендовалось разделять зоны выделения ДНК и приготовления ПЦР-образцов [Kitchin et al., 1990]. Для очистки рабочих поверхностей предлагалось использовать 2 М HCl и 10%-ный гипохлорит натрия [Prince, Andrus, 1992], 250 мМ гидрохлорид гидроксиламина [Aslanzadeh, 1993] и ряд других агентов [Morono et al., 2012].

Сделать ДНК непригодной к репликации можно с помощью УФ-света [Sarkar, Sommer, 1990]. УФ-облучению подвергают как уже готовую смесь для проведения ПЦР (без добавления целевой ДНК), так и отдельные ингредиенты [Goldenberger et al., 1995; Gefrides et al., 2010]. Однако имеются данные о том, что элиминировать контаминацию ПЦР-смеси с помощью УФ-облучения не всегда удается [Dwyer, Saksena, 1992]. Показано, что УФ-облучение сухой ДНК оказывает на нее не столь заметное повреждающее действие как на ДНК, находящуюся в растворе [Fairfax et al., 1991].

Одним из самых загрязненных ингредиентов ПЦР-смесей является ДНКполимераза [Bottger, 1990; Ehricht et al., 2007]. В препаратах полимеразы Таq присутствует ДНК соответствующих микроорганизмов-продуцентов – *E.coli* или *Thermus aquaticus* [Rand, Houck, 1990]. Для ее удаления применяют ДНКазу [Silkie et al., 2008], частощепящие рестрикционные эндонуклеазы [Ashkenas et al., 2005; Ma et al., 2017], экзонуклеазу III [Zhu et al., 1991], сорбцию на DEAE-целлюлозе [Glushkov et al., 2009], ультрафильтрацию [Mohammadi et al., 2005].

Популярным способом устранения кросс-контаминации является добавление в ПЦР-смеси урацил-ДНК-гликозилазы (УДГ) [Longo et al., 1990; Goldenberger et al., 1995; Hsieh et al., 2014]. Успешная деконтаминация с помощью урацил-ДНК-гликозилазы была продемонстрирована при работе с дДНК [Pruvost et al., 2005]. На способности псораленов образовывать с ДНК разнообразные фотоаддукты под действием УФ основан еще один подход к ПЦР-стерилизации [Jinno et al., 1990; Rowther et al., 2005]. Аналогичный эффект был достигнут с помощью моноазида этидия [Rueckert, Morgan, 2007]. Детальное исследование привело к выводу, что ни один из предложенных способов деконтаминации не в состоянии обеспечить должную степень чистоты, и необходим комплексный подход [Champlot et al., 2010].

Образование неспецифических ампликонов может быть связано не только с проблемой кросс-контаминации. Так, полимеразы с цепь-вытесняющей активностью способны достаточно эффективно вести неспецифический ДНК-синтез даже в отсутствие матрицы и праймеров [Zyrina et al., 2014]. Кроме того, в изотермических методах используются особые системы праймеров. Так, в LAMP-амплификации задействованы как минимум 4 праймера. Однако известно, что чем больше праймеров участвует в реакции, тем труднее подобрать их так, чтобы не происходило образования димерных структур. В случае LAMP размер ключевых праймеров увеличен, что повышает вероятность возникновения вторичных структур, способных удлиняться полимеразой. В ряде экспериментальных и обзорных статей поднимаются вопросы специфичности LAMP [Зырина, Антипова, 2021; Meagher et al., 2018; Rolando et al., 2020]. Построена модель, предсказывающая точность LAMP в зависимости от математическая последовательности праймеров [Schneider et al., 2019]. Ложноотрицательные результаты в LAMP могут быть обусловлены наличием замен нуклеотидов в определенных позициях праймеров [Peyrefitte et al., 2008; Wang, 2016]. Снижение уровня неспецифической амплификации ДНК в ходе LAMP обеспечивалось с помощью диметилсульфоксида [Wang et al., 2015], пуллулана [Gao et al., 2019], гидрофобной ионной магнитной жидкости [Ding et al., 2019].

1.3.4. Ингибиторы и энхансеры амплификации

Качество результатов и эффективность амплификации могут зависеть от наличия в образцах посторонних веществ, которые зачастую ингибируют синтез полинуклеотидных цепей [Lefevre et al., 2004; Kontanis, Reed, 2006]. К примеру, при выделении ДНК из биоматериалов человека возможно соосаждение вместе с ДНК солей желчных кислот, мочевины, гема, гепарина, белков и углеводов, ингибирующих ПЦР. Особого внимания требует обращение с ДНК из растительных объектов, препараты которой могут содержать значительные количества вторичных метаболитов. Ингибирующими агентами могут выступать также реагенты, использованные при выделении и очистке НК. Для исключения ингибирования реакций амплификации ключевым является понимание причин его возникновения. Считается, что ингибирование происходит за счет: 1) связывания ингибиторами полимеразы [Bickley et al., 1996; Eckhart et al., 2000]; 2) взаимодействия ингибитора с ДНК; 3) связывания ингибиторами кофактора (ионов магния) [Demeke, Jenkins, 2010; Alaedd*ini*, 2012; Schrader et al., 2012]. Для некоторых ингибиторов отмечено влияние на реакцию более чем одним способом [Opel et al., 2010].

Весьма сильными ингибиторами ПЦР являются гуминовые и фульвовые кислоты почв, попадающие в НК-препараты из почвенных образцов. Данные кислоты являются главными загрязнителями дДНК из погребенных костных останков. Гуминовая кислота ингибирует ПЦР посредством сиквенс-специфичного связывания с ДНК [Opel et al., 2010]. Другие соединения, такие как гем и меланин, влияют, по-видимому, на процессивность ДНК-полимеразы [Akane et al., 1994; Eckhart et al., 2000]. Ингибирующее воздействие коллагена на ПЦР отмечается в работах разных авторов [Scholz et al., 1998; Kim et al., 2000]. Отмечено ингибирование ПЦР фитиновой (инозитгексафосфорной) кислотой при амплификации НК, выделенных из коровьего кала, которое удалось преодолеть с помощью фермента фитазы из гриба Aspergillus niger [Thornton, Passen, 2004]. Некоторые ингибиторы, такие как ионы кальция и дубильные кислоты, также взаимодействуют с полимеразой, о чем свидетельствует повышение эффективности амплификации при ее добавлении. Ионы кальция, основного неорганического компонента кости, действуют как конкурентный ингибитор ионов магния [Bickley et al., 1996]. Ингибирование дубильными кислотами, которые хелатируют ионы магния, снижается при добавлении полимеразы и его солей [Wilson, 1997].

На сегодняшний день доступны коммерческие наборы для получения достаточно чистых ДНК-препаратов. Так, было показано, что очистка с помощью набора NucleoSpin DNA Clean-Up XS приводит к устранению ингибирования ПЦР большим количеством

известных ингибиторов: желчными кислотами, коллагеном, гемом, гуминовыми кислотами, индиго, меланином, таннинами, мочевиной [Faber et al., 2013]. Удаление из препаратов ДНК гуминовых кислот с использованием специального сорбента Supelite DAX-8 продемонстрировано в [Schriewer et al., 2011]. Дополнительная очистка препаратов НК от ингибирующих примесей может быть достигнута их переосаждением этанолом или изопропанолом [Hanni et al., 1995], высаливанием [Fang et al., 1992], избирательным осаждением полиэтиленгликолем 6000 [de Castillo Agudo et al., 1995], с помощью гельфильтрации [Sorensen et al., 2003], активированного древесного угля [Abolmaaty et al., 2007], ионообменной хроматографии [Goodyear et al., 1994]. Очистить ДНК от гуминовых кислот удалось при помощи флокуляции сульфатом алюминия [Braid et al., 2003]. Оригинальный способ очистки был применен для препаратов из крови, плазмы, мочи [Sur et al., 2010]. Кроме того, был разработан ряд методов улучшения ПЦР-амплификации в присутствии ингибиторов [Hofreiter, Shapiro, 2012].

Ингибирование ПЦР часто вызывает получение ложноотрицательных результатов, для исключения которых было предложено несколько подходов. После появления ПЦР-РВ были разработаны специальные контроли на основе проб TaqMan [Hartman et al., 2005]. Стала вестись количественная оценка уровня ингибирования [Nolan et al., 2005; Ellison et al., 2011], в том числе с помощью цифровой ПЦР [van Doorn et al., 2009]. Еще один подход заключался в использовании ДНК-полимераз, нечувствительных или в значительно меньшей степени чувствительных к загрязнениям реакционной смеси. Так, использование полимеразы Tth вместо Taq позволило провести амплификацию даже тех образцов, которые содержали значительное количество крови (до 8%) [Panaccio, Lew, 1991] и фенола [Katcher, Schwartz, 1994]. Меньшую чувствительность к ПЦР-ингибиторам она проявила и при обнаружении вирусной РНК [Poddar et al., 1998; Wiedbrauk et al., 1995]. Тth полимераза оказалась нечувствительна к миоглобину [Belec et al., 1998]. Снижение чувствительности ДНК-полимераз к ингибиторам достигается созданием генно-инженерных (рекомбинантных) ДНК-полимераз [Kermekchiev et al., 2009; Baar et al., 2011]. Был проведен целый ряд исследований чувствительности ДНК-полимераз к разным ингибиторам [Abu Al-Soud, Radstrom, 1998, 2000, 2005; Hedman et al., 2011].

В противоположность ингибиторам ПЦР, есть вещества, повышающие ее эффективность – ПЦР-энхансеры. Считается, что эффект, оказываемый ими, достигается несколькими способами: 1) снижение температуры плавления НК (ДМСО, формамид, бетаин, эктоин), 2) защита полимераз от стрессовых факторов, таких как повторяющиеся циклы нагрева и охлаждения (трегалоза, эктоины), 3) стабилизация НК и полимераз (детергенты, белки), 4) увеличение диэлектрической постоянной раствора, что приводит к

изменению электростатического окружения молекул НК (тетраалкиламмониевые соли, бетаин), 5) влияние на конформацию ДНК (сульфоксиды, сульфоны, эктоины) [Kurz, 2008].

Компонентом, присутствие которого в увеличенной концентрации способно снимать эффект ингибирования ПЦР, является БСА [Rohland, Hofreiter, 2007b]. Помимо БСА, для преодоления ингибирования было предложено добавлять в реакционную смесь белок gp32 фага Т4, также связывающийся с одноцепочечной ДНК [Kreader, 1996]. Добавление поливинилпирролидона в реакционную смесь способствовало амплификации препаратов ДНК, загрязненных полисахаридами [Koonjul et al., 1999], а присутствие ацетамида в концентрации 5% масс. способствовало амплификации дДНК [Reysenbach et al., 1992]. Было показано положительное влияние на ПЦР таких соединений как детергенты [Demeke, Adams, 1992], гликоли [Zhang et al., 2009], тетраалкиламмониевые соли [Chevet et al., 1995; Kovarova, Draber, 2000; Shaik et al, 2008], бетаин [Henke et al., 1997], сульфоксиды [Chakrabarti, Schutt, 2002], сульфоны [Chakrabarti, Schutt, 2001], аналоги нуклеотидов [Turner, Jenkins, 1995], трегалоза [Spies et al., 2004; Horáková et al. 2011], эктоины [Meyer et al., 2017]. Показано, что ДНК-полимераза Тад сохраняет ферментативную активность после инкубации с трегалозой при 95°С в течение 90 мин [Spiess et al., 2004]. Способность трегалозы к стабилизации биомолекул применяется для долговременного хранения НК [Clermont et al., 2014]. Сообщалось также, что сахароза оказывает влияние на эффективность ПЦР, в то время как некоторые другие углеводы данной способностью не обладают [Louwrier, van der Valk, 2001]. Детально изучено влияние ацетамида, бетаина, БСА, декстранов 40 и 500, ДМСО, формамида, глицерина, белка gp32, Нонидета Р-40, полиэтиленгликолей 400 и 4000, хлорида тетраметиламмония, Tween 20 и 80 на протекание ПЦР в присутствии таких ингибиторов как кровь, фекалии и мясной гомогенат [Abu Al-Soud, Radstrom, 2000]. Позднее было оценено влияние 11 энхансеров при ПЦР-амплификации образцов, содержавших ДНК Helicobacter pilori и желчные кислоты [Abu Al-Soud et al., 2005].

1.4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ научной литературы показывает неснижающийся интерес исследователей к проблеме амплификации НК. При выполнении запроса по ключевым словам "nucleic acids amplification" в базе PubMed генерируется статистическая диаграмма, отражающая публикационную активность в области, связанной с разработкой и использованием методов амплификации НК (рис. 1.7). Согласно диаграмме, резкий рост числа публикаций пришелся на период 1985-1993 гг., когда происходило развитие метода ПЦР и внедрение различных его вариантов в практику исследовательских и диагностических лабораторий. С 1994 г. по 2004 г. ежегодное количество публикаций держалось на уровне примерно 1500-1800 единиц. Начиная с 2005 г. количество публикаций, содержащих указанные ключевые слова, превышало ежегодно 2000, что связано с развитием методов изотермической амплификации, новыми техническими решениями, расширением и усложнением спектра НК-мишеней.



Рис. 1.7. Количество публикаций, выдаваемых при выполнении запроса по ключевым словам "nucleic acids amplification" в базе научной литературы PubMed (по состоянию на 01.10.2024 г.).

Развитие методов амплификации НК определялось несколькими вызовами. Одним из них стала необходимость изучения и анализа НК-объектов различной природы. Например, ПЦР, предложенная сначала для амплификации ДНК, позднее была адаптирована для амплификации РНК, для SNP-типирования была разработана аллельспецифическая ПЦР, и т.д. При рассмотрении амплификации НК как основы методов обнаружения различных мишеней (молекулярной диагностики) ключевой проблемой являлось и остается до сих пор обеспечение высокой специфичности и чувствительности анализа. Это комплексная задача, которая включает решение вопросов, связанных с дизайном праймеров, поиском или созданием более точных и процессивных полимераз, деконтаминацией рабочего пространства и реактивов, исключением влияния посторонних ингибирующих веществ, и ряд других.

Отдельно следует отметить необходимость проведения экспресс-/полевых анализов, требующих "ускоренной" амплификации с сохранением высокой достоверности результатов. Создание новых молекулярных инструментов (праймеров с новыми типами химических модификаций, генно-инженерных полимераз) обусловливает разработку принципиально новых или усовершенствованных подходов и технологий. С развитием методов молекулярной динамики и квантовой химии значительный прогресс был достигнут при изучении взаимодействий НК с ферментами нуклеинового обмена. Однако до сих пор результативность *in silico* подходов ограничена возможностями вычислительной техники ввиду сложности изучаемых биомолекулярных систем.

В последние два десятилетия пришло четкое понимание того, что динамические свойства молекул НК и взаимодействия в системе "НК – НК-полимераза" контекстнозависимы, т.е. определяются нуклеотидной последовательностью (первичной структурой) НК. Важными представляются данные о предпочтительности фрагментации ДНК по определенным нуклеотидным сайтам. Необходимость амплификации разрушенной ДНК привела к изучению особенностей расщепления молекул ДНК как полимера. Данный аспект имеет огромную практическую ценность, поскольку подобные сведения лучше ориентируют исследователей на этапе выбора нуклеотидных последовательностей для дальнейшей работы, обеспечивая тем самым успешность и бо́льшую точность анализа.

Таким образом, разнообразие решаемых задач делает актуальными поиск новых оригинальных способов амплификации и детекции НК и связанную с ним разработку более совершенных молекулярных инструментов для их проведения. В то же время, подобный поиск сдерживается отсутствием полных данных об отдельных свойствах молекулярных компонентов и присущих им недостатках, о причинах протекания побочных процессов в амплификационных системах.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Реактивы и материалы

Ферменты:

ДНК-полимеразы AmpliTaq Gold, Phire, Phusion U, Maxima Hot Start Taq, Taq, Bsm, phi29, Phusion HF, протеиназа K, PHKaзa A, T4 полинуклеотидкиназа, T4 ДНК-лигаза, T4 PHK-лигаза, обратная транскриптаза MMLV, T4 ДНК-полимераза (все Thermo Fisher Scientific); ДНК-полимеразы Vent exo-, 9°Nm, Hemo KlenTaq, Bsu, Bst LF, Bst 2.0, Bst 2.0 WarmStart, Bst 3.0, Q5 Hot Start, поли(A)-полимераза, экзонуклеаза I (Exo I), эндонуклеазы HpaII, McrBC и HhaI (все New England Biolabs); ДНК-полимеразы Bst-Synta, Taq-Synta, MMLV-Synta, лигаза T4-Synta (SynGen); T4 полинуклеотидкиназа, CpG метилтрансфераза (M.SssI), фрагмент Кленова (все Сибэнзим).

Реактивы:

амидофосфиты (dA-CE, dC-CE, dG-CE, dT-CE), носители для синтеза олигонуклеотидов (ОДН) (dA-CPG, dC-CPG, dG-CPG, dT-CPG), 5-(этилтио)-1*H*-тетразол (все Glen Research); 3-морфолинопропансульфокислота (MOPS), перхлорат лития, аденозинтрифосфорная кислота $(AT\Phi),$ формамид, ацетат калия, поливинилпирролидон, N.N.N'.N'тетраметилэтилендиамин (TEMED), цетилтриметиламмоний бромид (ЦТАБ), динатриевая соль N,N,N',N'-этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) (все AppliChem); 2меркаптоэтанол, N,N'-метиленбисакриламид, Tween 20, бычий сывороточный альбумин (BSA), ампициллин, фиколл 400, диметилсульфоксид, тетрациклин, бромид этидия, аспарагиновая кислота, галактоза, лактоза, манноза, трегалоза (все Sigma-Aldrich); X-gal, изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (IPTG), ДНК фага лямбда dam-/dcm-, дитиотреитол (ДТТ), маркеры O'GeneRuler 10-300 bp и O'GeneRuler 100 bp (все TFS); абсолютные ацетонитрил и тетрагидрофуран "для синтеза ДНК", аммиак водный, фенол (все Panreac); акриламид, агароза для электрофореза ДНК, хлороформ, бромфеноловый синий, ксиленцианол, додецилсульфат натрия (SDS), сахароза, трис, Triton X-100 (все Amresco); бакто-триптон (Difco); маркеры длин ДНК 50 bp DNA и Low molecular weigth DNA (New England Biolabs); SYBR Green I и dsGreen (Люмипроб); смесь для ПЦР в реальном времени с Eva Green (Синтол); сульфат аммония, хлориды натрия, калия, кальция, марганца, кадмия, кобальта, меди, никеля, цинка, гидроксид натрия, уксусная кислота, спирты этиловый, изопропиловый, изоамиловый, глицерин, гидрохинон, ацетон, агар, дрожжевой экстракт, нуклеозидтрифосфаты, персульфат аммония, ацетат триэтиламмония, мочевина, глюкоза, инулин, фруктоза, маркер

pUC19/MspI (отечественного производства, фирм Хеликон, Диа-М, ХимРеактивСнаб, квалификации "ХЧ" или "для молекулярной биологии").

TAE	40 мМ Трис-ацетат (рН 7,6), 2 мМ ЭДТА
TE	10 мМ Трис-HCl (pH 8,0), 1 мМ ЭДТА
Thermopol-C	20 мМ Tris-HCl (pH 8,8), 10 мМ (NH ₄) ₂ SO ₄ , 10 мМ KCl, 0,1% Triton X-100
Isothermal-C	20 мМ Tris-HCl (pH 8,8), 10 мМ (NH ₄) ₂ SO ₄ , 50 мМ KCl, 0,1% Tween 20
Isothermal II-C	20 мМ Tris-HCl (pH 8,8), 10 мМ (NH ₄) ₂ SO ₄ , 150 мМ KCl, 0,1% Tween 20
Taq-C	68,8 мМ Tris-HCl (pH 8,8), 18 мМ (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,1% Tween 20
Taq-ME-C	60 мМ Tris-HCl (pH 8,8), 25 мМ KCl, 10 мМ β-меркаптоэтанол,
	0,1% Triton X-100
пользовательский	20 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 10 мМ (NH ₄) ₂ SO ₄ , 10 мМ KCl, 2 мМ MgCl ₂ ,
буфер №1	0,1% Tween 20
пользовательский	20 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 10 мМ (NH ₄) ₂ SO ₄ , 50 мМ KCl, 2 мМ MgCl ₂ ,
буфер №2	0,1% Tween 20
среда LВ жидкая	бакто-триптон (1%), дрожжевой экстракт (0,5%), NaCl (1%)
среда LВ твердая	бакто-триптон (1%), дрожжевой экстракт (0,5%), NaCl (1%), агар (1,5%)

Таблица 2.1. Составы использованных буферных растворов (1×) и питательных сред.

Для приготовления растворов использовали воду высшей категории качества (>18 МОм, Millipore), растворы перед применением фильтровали через насадки Chromafil XtraPET-20/25 (Macherey-Nagel) с размером пор 0,2 мкм.

2.2. Олигонуклеотиды, использованные в работе

Нуклеотидные последовательности использованных в работе олигонуклеотидов (ОДН) представлены в таблицах 2.2-2.11. Для модельных экспериментов подбирали ОДН с искусственными последовательностями, не гомологичными каким-либо известным последовательностям в геномах живых организмов. Часть праймеров подбирали на основе последовательностей, депонированных в Генбанке [https://www.ncbi.nlm.nih.gov]. ОДН, в том числе искусственные НК-матрицы и праймеры к ним, конструировали с использованием OligoAnalyzer (Integrated DNA Technologies [http://eu.idtdna.com/calc]), DNAstar LaserGene [https://www.dnastar.com/], LAMPrimers iQ, NEB LAMP Primer Design [https://lamp.neb.com/#!/], Primer Explorer 5 [https://primerexplorer.jp/e/], Primer 3 [https://primer3.org/]. Мишень-специфичность праймеров проверяли *in silico* с помощью BLAST [http://blast.ncbi.nlm.nih.gov].

NG NG	III 1		Длина,	Тотж.,	Размер	Организм/
JNOJNO	шифр	Последовательность, $3 \rightarrow 3$	НТ	°C*	ампликона, п.о.	номер в Генбанке
1.	F1	CGTGTGAAACATAACGCAGGGAGAT	25	59,2	166	Богомол
2.	R166	GGAACACGACTCTGAGGACAGC	22	59,5		обыкновенный
3.	R621	CCTCGATTGCTACCGTCGAACTG	23	59,5	621 (c F1)	M. religiosa/
4.	R1029	GTTTCCCCTGACTTCGTCCTGG	22	59,7	1029 (c F1)	AY491212.1
5.	F2	CCGTTGGATTGGGGTCTAAGGC	22	60,2	252	
6.	R'352	GGTTTAGTGTTTCCCAGTGACTCGC	25	59,7		
7.	R'349	GTTGAGTCTCCCCTTTCGACCTTC	24	59,1	349 (c F1)	
8.	F3	CCGAAAGATGGTGAACTATGCCTGG	25	59,6	47 (c R1029)	
9.	MR br aF1	TGTTCCTTGAGAGTGGAGCACTA	23	57,5	50	Богомол
10.	MR br aR1	TTAGCCTTAGATGGAGTTTACCACCC	27	58,0		обыкновенный
11.	MR br aF2	GGACCAAGGAGTCTAACATGTG	22	55,1	4.4	M. religiosa/
12.	MR br aR2	TCTGCGTTTAGTGTTTCCCAGT	22	56,6		FJ806632.1
13.	F n0	CATAATCAATCGAACAAATTATTATATTCAA	31	50,2	05	Пчела медоносная
14.	R n0	TTATCGTTAAATTATCGATTAATTACGATA	30	50,0	95	Apis mellifera/
15.	F n3	GGGATATTATGTTACATGGCAT	22	50,3	60	HQ188204.1
16.	R n3	AAAAAGAAGATGGATTTGATGAG	23	49,4		
17.	F n9	GCTTCCACCAACCTCAATCA	20	55,3	65	
18.	R n9	GATTTACTTCCTGGAAGTAAGGTGG	25	55,1		
19.	F 150-0	GTTTTATCATATTGAGGAGCAACAGC	26	54,6	150	Пчела медоносная

Таблица 2.2. Праймеры, использованные для изучения фрагментации ДНК.

20.	R 150-0	AATAGATGAAGAATTGCTATGAATAGAATTACT	33	53,5		A. mellifera/ NW_003377861.1
21.	F 150-9	СТСССТТТСТССТТGСТТС	21	55,1		Пчела медоносная
22.	R 150-9	AACCTCTATAATAAATCTGAACCCAATTATTC	32	53,9	154	<i>A. mellifera/</i> NW_003377865.1
23.	F 150-17	AGGAGAGAAACAATAGTTTGGTTGAC	26	55,2		Пчела медоносная
24.	R 150-17	CGAATCTTGTTTTCATAGAGTGCTTT	26	54,1	157	A. mellifera/ NW_003377861.1
25.	F 200-10	GAATGCAAAGGTTAGCTTCCTTTTTC	26	55,3		Пчела медоносная
26.	R 200-10	AAATAACCTCTATAATAAATCTGAACCCAAT	31	53,3	199	Apis mellifera/ NW_003377865.1
27.	F 300-0	GATTCTTGTTCTTCAAGCCTGCTATT	26	55,7	282	Пчела медоносная
28.	R 300-0	CCACATGACATGAACTTCATTCTATGA	27	55,2	262	Apis mellifera/
29.	F 300-13	GTCTTCCTTCCCCTGACAT	19	53,9	300	NW_003377867.1
30.	R 300-13	TTTGGTAGCTGTCTACATTTACATTATTG	29	53,9	500	
31.	F 300-27	GGTGAAAATACACGAGTACCTAGAAG	26	54,9	300	
32.	R 300-27	CACTTGCACAAGTATAGACATGAAAC	26	54,4	500	
33.	F 400-10	TTTCAATTTAATTGAGAAGAAAAAGAAAATAGAAC	35	53,3		Пчела медоносная
34.	R 400-10	CATAAACTCATTGTTGTGTTGTTGTTAAACC	28	53,8	401	Apis mellifera/ NW_003377865.1
35.	F 300-36	GAATTTTTCACTTCTTCACACACCAC	26	55,1	304	Пчела медоносная

36.	D 200 26		30	54,4		Apis mellifera/
	K 300-30	GCTATGAAGTAGTCTTATATAGATGGACAC				NW_003377853.1
37.	F 450-0	AAATATCCTCCCCTAATAAAGGTTTGG	27	54,8		Пчела медоносная
38.	R 450-0	TTTGGTAGCTGTCTACATTTACATTATTG	29	53,9	448	Apis mellifera/ NW 003377867.1
39.	F 450-14	GCATCAAAAGCAGCATCAAAGG	22	55,5	442	Пчела медоносная
40.	R 450-14	СТААССТААТСТААССТААСАТААССТААТСТ	32	54,1		Apis mellifera/
41.	F 450-32	GGAAGATGAAATGTAGCAGAGGAAAG	26	55,6	454	NW_003377865.1
42.	R 450-32	AAAAGAGAGAGAGAGGGGGGGGGGAGGA	22	56,5	. т <i>у</i> т	
43.	F 450-57	GAGCAGGAATTGGTCTTGGAC	21	55,9	441	
44.	R 450-57	GAGAGGTGTATTCACTCAGGTATATTC	27	54,3		

* найдено с помощью OligoAnalyzer.

Таблица 2.3. Праймеры, использованные для изучения метилирования ДНК.

No No	Шифр		Ллина нт	T °C*	Размер ампликона,
10110	шифр	, inconceptuation billocities, 5 - 75		готж., С	П.О.
45.	phL F1	GAGGTGATAAAATTAACTGCTTAACTGTCAATG	33	56,6	167 (c phLR4)
46.	phL R2	GGAGCACCATGCAATATGCC	22	59,1	139 (c phL F7)
47.	phL F3	GCGTAAGGCGTGGGATGTG	19	59,0	154
48.	phL R3	CGCGCCATCATCCGGCAT	18	61,7	101
49.	phL F4	CTGTTCTTGCGGTTTGGAGGAATTG	25	58,7	345

50.	phL R4	TTAGCAGAGCCAAGCCACAAC	21	58,0	
51.	phL F5	GATGCAGGTAGCCAGTGAGCATATTG	26	59,5	356
52.	phL R5	GTTCAGTCTTAAAAGCAATTGGCGGTG	27	58,9	550
53.	phL F6	GATCAGCAGCCTGACGGATG	20	58,2	342
54.	phL R6	CGGTTTTATGTCACGCACACGG	22	59,0	542
55.	phL F7	TGGGACTCCTGGCTGATTAAGTATGT	26	59,2	400
56.	phL R7	CGTAATGACAGAGGAAAAACTTCACCAGATT	31	58,7	433
57.	phL F8	CAAATACTGTGATGACCATTTCGGG	25	56,2	480
58.	phL R8	AGCTGCCCTCCAAATATTTCG	21	55,5	400
59.	phL F9	ATGCGCTGTATGCCGGTATG	20	58,0	/61
60.	phL R9	TTCACCGCCAGCACACGA	18	60,1	401
61.	GAPDH F	GGAAGGTGAAGGTCGGAGTCAACGG	25	62,9	140
62.	GAPDH R	CTCTCCTTGCGGGGAACAGCTAC	23	61,5	149
63.	IL2 F	GCATGAATTAGAGCTATCACCTAAGTGTGGGCT	33	62,3	128
64.	IL2 R	CCTTCATTTTTCCTCTTCTGATGACTCTTTGG	32	59,0	128
65.	DNMT1 R F	TCTGCTGAAGCCTCCGAGATGC	22	61,4	1/10
66.	DNMT1 R R	CCAGCGCCCTGCCTGT	16	62,0	147
67.	DNMT1 P F	CCCAAATACAGCAAGCTTTGGGTTCGTTTCC	31	63,1	158
68.	DNMT1 P R	GACACCGGAAGTGGAGGCCGAAGT	24	64,9	150
69.	KEAP1 R F	AAGGGACAGTGAGAAGGGGGG	21	61,0	102
70.	KEAP1 R R	TGCGGGGTCTTGGTTGTCGGTT	22	63,7	172

71.	KEAP1 P F	AACCTAGCGAGGTAGATAATTTTCCCTAGATCCTG	35	61,1	159
72.	KEAP1 P R	CCCTTCTCACTGTCCCTTCCATCTCCC	27	63,6	155
73.	NFE2L2 R F	GTCGCTGGAGTTCGGACGCTTTGAAACAG	29	64,4	204
74.	NFE2L2 R R	CAGTGGCACGGTCTGGGTCCAAATCTTTAG	30	63,7	204
75.	NFE2L2 P F	CCGCAAATAAGGGCAGCGCTCT	22	62,6	140
76.	NFE2L2 P R	GCAGCTCCTACACCAACGCCTTTC	24	62,3	140
77.	RASSF1 R F	TCATTGAGCTGCGGGAGCTGGCA	23	65,5	100
78.	RASSF1 R R	CAGATGAAGTCGCCACAGAGGTCGCA	26	64,2	177
79.	RASSF1 P F	AGCCAAGGGGCAGCGCAGT	19	65,6	1/13
80.	RASSF1 P R	CGAGTGGAGTGCGACAAGGGATAAACCA	28	63,5	175
81.	CDKN2A R F	GACCAAGTTTCGCTCTTGTCTCCCAGG	27	62,6	273
82.	CDKN2A R R	GGTGGCTCACGTCTATAATCCCAGCATTCT	30	62,8	275
83.	CDKN2A P F	CTGTGTTGGAGTTTTCTGGAGTGAGC	26	59,6	13/
84.	CDKN2A P R	CCCCTGAGCTTCCCTAGTTCACAAAAT	27	60,4	154
85.	DNMT1 MS F	ACAGGGTATCGCCTCTCCCGTTTGGTA	28	63,9	594
86.	DNMT1 MS R	TGTGCGACCAAGCTGGAGTCAAGAG	25	62,8	- <u>-</u>
87.	KEAP1 MS R	GCGCAGGTCACCATGACTAAGCAGAG	26	63,1	859 (c KEAP1 P F)
88.	NFE2L2 MS F	ACCACCGCAGGGCCCAGA	18	65,2	736 (c NFE2L2 R R)
89.	RASSF1 MS F	CTCTAGCACAGTAAAGCTGGCCTCCAG	27	62,2	793
90.	RASSF1 MS R	CTCTGCTCATCTGTGGCCCAGATACGA	27	63,2	

* найдено с помощью OligoAnalyzer.

Ma Ma	III h a	Постологичности 5? 2?	Длина,	Т _{отж.} ,	Размер	Организм/
DNEDNE	шифр	Последовательность, 5 \rightarrow 5	НТ	°C*	ампликона, п.о.	номер в Генбанке
91.	AM F	ATGTCCACAACCCGATCAAGGC	22	59,9	255	Пчела медоносная
92.	AM R	CTCCCTCTGCTACCACGTTTACG	23	59,2	233	A. mellifera /
93.	AM aF	CGTTCCAAAGCGAGAGCGAC	20	58,8	29	XM_006557349.1
94.	AM aR	CGGTGGTTACGGGAACGC	18	59,1	. 30	
95.	AM nR1	GGGCACCTGTGCATCGG	17	59,7	55	
96.	AM nR2	CCTGGCACCCTTACGAGAGC	20	60,2	75	
97.	AM nR3	GGACACGATCATTCCAGGCGTTAG	24	59,6	99	
98.	HS F	CAGAATTCGAGCAGGCATTCCAAG	24	58,4	274	Человек
99.	HS R	GTCTGCCTGAGACCACACC	19	57,9	. 274	H. sapiens/
100.	HS aF	GGTGTGGTCTCAGGCAGACAT	21	59,3	47	AL391820.6
101.	HS aR	GCCACATCTGACATAGCTTGCTGTTC	26	59,9	47	
102.	HS nR1	GGCCAATGGTGGGCCA	16	59,2	59	
103.	HS nR2	TGGTGCATCCTCTGTCATTCAGCTA	25	59,8	86	
104.	HS nR3	GCCATCAATTTCCAGCCAAACCC	23	59,4	121	
105.	MR F	TTAAGGATCGTTTCGACGGAGCATC	25	58,8	260	Богомол
106.	MR R	CTGTCGTCCATGCGTTCCCT	20	59,8	200	обыкновенный
107.	MR aF	TCCAGCTCAAACCCTACAACCC	22	59,2	45	M. religiosa/
108.	MR aR	TGACTCCTGGAGGTTTGTGATCC	23	58,5	. 43	FJ802922.1
L	L		1	1		

Таблица 2.4. Олигонуклеотиды, использованные для изучения ПЦР со сближенными праймерами.
109.	PO F	AGTTCAAGAGACCCTCGATAAGA	23	54,9	268	Ель сибирская
110.	PO R	GTCTGTGTCTGACTATCGCC	20	54,9	208	P. obovata/
111.	PO aF	GCAGAATCAGGCTACGCTTA	20	54,8	42	JQ924420.1
112.	PO aR	GCCTTCTCAGCTAGATTTGGAT	22	54,6	42	
113.	PS F	GTCTTCAGGTCTCTTCCTCCC	21	56,5	200	Сосна обыкновенная
114.	PS R	CTGTTCCACTTCTACCTCTGTTC	23	54,8	299	P. sylvestris/
115.	PS aF	TACCATGACCCAAGAGGAGT	20	55,0	40	JQ969075.1
116.	PS aR	CCCGAGGAGGAATCTCGAAT	20	56,1	40	
117.	LS F	TTAGCCGCTTGCATCCTC	18	55,3	252	Лиственница
118.	LS R	CAAGAAGATGAGCGAAACAACAAC	24	54,9	235	Сукачева
119.	LS aF	TTGACGGGAGAGTGGTTG	18	54,5	27	L. sukaczewii/
120.	LS aR	CGAACGGTTGCACATCCTG	19	56,8		EU441982.1
121.	QR F	CAGACTAGGAAAGAGCAGATTGGA	24	56,1	200	Дуб обыкновенный
122.	QR R	CTAATGGAACACAAGCACAAACCAG	25	56,7	299	Q. robur/
123.	QR aF	AAAGATCAGAACTTGACCCCAGG	23	56,8	47	AY333927.1
124.	QR aR	AATAACAGTCTCTCCTTGCCTTGC	24	57,2	47	
125.	TC F	TCGTGACTCCTTTCTTGCGA	20	56,3	265	Липа сердцевидная
126.	TC R	CCTACGGGAGGCCATTTTCC	20	58,1	203	T. cordata/
127.	TC aF	ACGATCGGTGGTAATGCTCC	20	57,1	40	KF897521.1
128.	TC aR	ACTGGAGACAAGGCACGCTA	20	58,5	40	
129.	ApM aF-A	CGTTCCAAAGCGAGAGC <u>C</u> AA**	18	58,2	-	Пчела медоносная

130.	ApM aF-C	CGTTCCAAAGCGAGAGC <u>C</u> AC	18	58,9		A. mellifera/
131.	ApM aF-G	CGTTCCAAAGCGAGAGC <u>C</u> AG	18	58,7		XM_006557349.1
132.	ApM aF-T	CGTTCCAAAGCGAGAGC <u>C</u> A T	18	58,0		
133.	ApM nR-1	GCGGTGGTTACGGGAACG	18	59,1	39	
134.	ApM nR-2	GGCGGTGGTTACGGGAAC	18	59,0	40	
135.	ApM nR-3	CGGCGGTGGTTACGGGAA	18	60,6	41	
136.	ApM R	GGGCACCTGTGCATCGG	17	59,7	53	

* найдено с помощью OligoAnalyzer.

** жирным шрифтом выделены дискриминирующие нуклеотиды, подчеркиванием – мисматч-позиции.

NºNº	Шифр	Последовательность, 5'→3'	Длина,	Т _{отж.} ,	Размер ампликона,	Размер димера,
			HT	-C.+	п.о.	п.о.
137.	F0	CCTCTTGCTTTCGCTCTCGTTCTTT	25	59,3	51	_
138.	R0	TGGTCTTCTTCTCGTCTGTGTTCTGT	26	59,4	51	
139.	ТО	CCTCTTGCTTTCGCTCTCGTTCTTTACAGAACACAGACGAG AAGAAGACCA	51	-	-	-
140.	S0	AGCAAGAGGTGGTCTTC	18	-	-	-
141.	F1a	CCTCTTGCTTTCGCTCTCGTTCTTTC**	26	59,7	52	51
142.	R1a	GGTCTTCTTCTCGTCTGTGTTCTGT G	26	58,9	52	51

Таблица 2.5. Олигонуклеотиды, использованные при изучении димеризации праймеров.

143.	F1b	CCTCTTGCTTTCGCTCTCGTTCTTTA	26	58,8	52	51
144.	R1b	GGTCTTCTTCTCGTCTGTGTTCTGTT	26	58,4	. 32	51
145.	T1a	CCTCTTGCTTTCGCTCTCGTTCTTTCCACAGAACACAGACG AGAAGAAGACC	52	-	-	-
146.	T1b	CCTCTTGCTTTCGCTCTCGTTCTTTAAACAGAACACAGACG AGAAGAAGACC	52	-	-	-
147.	F2a	TCTTGCTTTCGCTCTCGTTCTTTCC	25	59,3	51	49
148.	R2a	GTCTTCTTCGTCTGTGTGTTCTGTGG	26	58,9		Υ <i>Υ</i>
149.	F2b	TCTTGCTTTCGCTCTCGTTCTTTCT	25	58,5	51	49
150.	R2b	GTCTTCTTCTCGTCTGTGTTCTGTAG	26	56,6		
151.	F2c	TCTTGCTTTCGCTCTCGTTCTTT T	25	57,4	51	49
152.	R2c	GTCTTCTTCGTCTGTGTGTTCTGTAA	26	56,2		
153.	T2a	TCTTGCTTTCGCTCTCGTTCTTTCCCCACAGAACACAGACG AGAAGAAGAC	51	-	-	-
154.	T2b	TCTTGCTTTCGCTCTCGTTCTTTCTCTACAGAACACAGACG AGAAGAAGAC	51	-	-	-
155.	T2c	TCTTGCTTTCGCTCTCGTTCTTTTTTTACAGAACACAGACG AGAAGAAGAC	51	-	-	-
156.	F3a	TGCTTTCGCTCTCGTTCTTTCCCC	23	59,6	49	46
157.	R3a	TCTTCTTCTCGTCTGTGTGTTCTGTGGGG	26	60,0		
158.	F3b	TGCTTTCGCTCTCGTTCTTTCTC	23	57,4	49	46

159.	R3b	TCTTCTTCTCGTCTGTGTGTTCTGTGAG	26	57,9		
160.	F3c	TGCTTTCGCTCTCGTTCTTTCTT	23	57,0	/10	46
161.	R3c	TCTTCTTCTCGTCTGTGTTCTGTAAG	26	56,1	Ч /	10
162.	F3d	TGCTTTCGCTCTCGTTCTTTATT	23	54,9	40	16
163.	R3d	TCTTCTTCTCGTCTGTGTTCTGTAAT	26	55,6	47	40
164.	T3a	TGCTTTCGCTCTCGTTCTTTCCCCCCACAGAACACAGACGA	40			
		GAAGAAGA	47	-	-	-
165.	T3b	TGCTTTCGCTCTCGTTCTTTCTCCTCACAGAACACAGACGA	40			
		GAAGAAGA	47	-	-	-
166.	T3c	TGCTTTCGCTCTCGTTCTTTCTTCTTACAGAACACAGACGA	40			
		GAAGAAGA	49		-	-
167.	T3d	TGCTTTCGCTCTCGTTCTTTATTATTACAGAACACAGACGA	40			
		GAAGAAGA	47	-	-	-
168.	T100	CCTCTTGCTTTCGCTCTCGTTCTTTCCCTGTGTGATGCGGTT				
		GTAGATCTGGTTTAGGTTTGGTAGTTGTGCCCACAGAACA	100	-	-	-
		CAGACGAGAAGAAGACCA				
169.	MR aF2	GAACAGCGGAGGAAATGGTGGTAG	24	59,6	16	11
170.	MR aR2	GTAGCGATTCTTTCGGCCACCT	22	59,5	40	44
171.	MR F	ACAGCGGAGGAAATGGTGGTAG	22	59,1	252	
172.	MR R	GTATCTCCTGCGTCTTGTAGCCTC	24	59,2	232	-
173.	MR R2	AGTATCTCCTGCGTCTTGTAGCCT	24	59,3	253 (c MR	44

r	r					
					aF2)	
174.	L aF	CTGCACCTGATATTGAGTGGCCT	23	59,1	53	_
175.	L aR	ACAAAACGATTACTCCATAACAGGGACAGC	30	60,2		
176.	L aR2	CACAAAACGATTACTCCATAACAGGGACAG	30	59,0	54 (c L aF)	52
177.	LF	CAGTGAGCATATTGCGCCGCTT	22	60,6	52 (c L aR2)	54
178.	LF2	CAGTGAGCATATTGCGCCGCT	21	60,6	51 (c L aR2)	53

* найдено с помощью OligoAnalyzer.

** жирным шрифтом выделены нуклеотиды, обеспечивающие образование 3'-концевых димеров.

Таблица 2.6. Олигонуклеотиды, использованные для изучения мультимеризации.

№№ Шифр		Последовательность $5^{2} \rightarrow 3^{2}$	Длина,
		Tioesiegobaresibiloerib, 5 75	НТ
179.	LT1	CAGTCCTGTAGTGCTCAGTGTCGTCGTACAGCCTACATTG	40
180.	LT2	CCTGTCAGTCCTGTAGTGCTCAGTGTCGTCGTACAGCCTACATTGCCAGT	50
181.	LT3	CCTGTCAGTCCTGTAGTGCTCAGTGCTACAGCCCAGCCATTCCTACATTGCCAGT	55
182.	LT4	CCTGTCAGTCCTGTAGTGCTCAGTGTCGTCGTACAGCCACTATATTCCTACATTGCCAGT	60
183.	LT5	CCTGTCAGTCCTGTAGTGCTCAGTGTCGTCGCCCAGCCATTCGACTATATTCCTACATTGCCAGT	65
184	LT6	CCTGTCAGTCCTGTAGTGCTCAGTGTCGTCGTACAGCCAGTTACTTAGACTATATTCCTACATTGC	70
10.11	LIU	CAGT	10
185.	LT7	CCTGTCAGTCCTGTAGTGCTCAGTGTCGTCGTACAGCCATCGCAGTTACTTAGACTATATTCCTAC	75
1001		ATTGCCAGT	

186.	LT8	CCTGTCAGTCCTGTAGTGCTCAGTGTCGTCGTACAGCCTCTTCATCGCAGTTACTTAGACTATATTC CTACATTGCCAGT	80
187.	LT9	CCTGTCAGTCCTGTAGTGCTCAGTGTCGTCGTACAGCCTTACCTCTTCATCGCAGTTACTTAGACTA TATTCCTACATTGCCAGT	85
188.	LT10	CCTGTCAGTCCTGTAGTGCTCAGTGTCGTCGTACAGCCTTACCAAGCTTCTTCATCGCAGTTACTTA GACTATATTCCTACATTGCCAGT	90
189.	LT11	CCTGTCAGTCCTGTAGTGCTCAGTGTCGTCGTACAGCCAGATCAACTAAAGCTTCTTCATCGCAGT TACTTAGACTATATTCCTACATTGCCAGT	95
190.	LT12	CCTGTCAGTCCTGTAGTGCTCAGTGTCGTCGTACAGCCAGATCAACTATTACCAAGCTTCTTCATC GCAGTTACTTAGACTATATTCCTACATTGCCAGT	100
191.	LT S1	CACTACAGGACTGCAATGTAGGCTG	25
192.	LT S2	CAGGACTGACAGGACTGGCAATGTA	25
193.	LT S3	TAGTGCTCAGTGTCGTCGTACAGCC	25
194.	LT F	CCTGTCAGTCCTGTAGTGCTCAGTG	25
195.	LT R1	ACTGGCAATGTAGGCTGTACGACGA	25
196.	LT R2	ACTGGCAATGTAGGAATATAGTGGCTGTA	29
197.	LT R3	ACTGGCAATGTAGGAATGGCTGGG	24
198.	LT R4	ACTGGCAATGTAGGAATATAGTGGCTGTA	29
199.	LT R5	ACTGGCAATGTAGGAATATAGTCGAATGGCT	31
200.	LT R6	ACTGGCAATGTAGGAATATAGTCTAAGTAACTG	33
201.	LT 42	GACATTACAGGAGAGTAGAGGAGTGGAGACGGACTGATTGTA	42

202.	LT 45	CGACATTACAGGAGAGTAGAGGAGTGGAGACGGACTGATTGTATG	45
203.	LT 48	ACGACATTACAGGAGAGTAGAGGAGTGGAGACGGACTGATTGTATGTA	48
204.	LT 49	TACGACATTACAGGAGAGTAGAGGAGTGGAGACGGACTGATTGTATGTA	49
205.	LT 50	TTACGACATTACAGGAGAGTAGAGGAGTGGAGACGGACTGATTGTATGTA	50
206.	LT 51	TTACGACATTACAGGAGAGTAGAGGAGTGGAGACGGACTGATTGTATGTA	51
207.	LT52	TTACGACATTACAGGAGAGTAGAGGAGTGGAGACGGACTGATTGTATGTA	52
208.	LT 53	CTTACGACATTACAGGAGAGTAGAGGAGTGGAGACGGACTGATTGTATGTA	53
209.	LT 54	CTTACGACATTACAGGAGAGTAGAGGAGTGGAGACGGACTGATTGTATGTA	54
210.	LT 57	GCTTACGACATTACAGGAGAGTAGAGGAGTGGAGACGGACTGATTGTATGTA	57
211.	LT 60	TTGCTTACGACATTACAGGAGAGTAGAGGAGTGGAGACGGACTGATTGTATGTA	60
212.	LT F42/45	CGACATTACAGGAGAGTAGAGG	22
213.	LT R42/45	CATACAATCAGTCCGTCTCCAC	22
214.	LT F48	ACGACATTACAGCAGAGTAGAGG	23
215.	LT R48	TACATACAATCAGTCCGTCTCCA	23
216.	LT F48	ACGACATTACAGCAGAGTAGAGG	23
217.	LT F49	TACGACATTACAGGAGAGTAGAG	23
218.	LT F50/51/52	TTACGACATTACAGCAGAGTAGAG	24
219	LT	TACATACAATCAGTCCGTCTCC	22
217.	R48/R49/R50		
220.	LT R51	ATACATACAATCAGTCCGTCTCC	23
221.	LT F53/F54	CTTACGACATTACAGCAGAGTAG	23

222.	LT R52/R53	CATACATACAATCAGTCCGTCTC	23
223.	LT R51-n1	CTACATACAATCAGTCCGTCTCC*	23
224.	LT R51-n2	CAACATACAATCAGTCCGTCTCC*	23
225.	LT R51-n3	CACCATACAATCAGTCCGTCTCC*	23
226.	LT F54	CTTACGACATTACAGCAGAGTAGAG	25
227.	LT R54	TCATACATCAGTCCGTCTC	24
228.	LT F57	GCTTACGACATTACAGGAGAGTAG	24
229.	LT R57	GTTCATACAATCAGTCCGTCT	25
230.	LT F60	TTGCTTACGACATTACAGGAGAGT	24
231.	LT R60	GGTTCATACATCAGTCCGTC	25
232.	LTa	GTCACGTCAGTCCTGTAGTGCTCAGTGTCGTCGTACAGCCTACATTGCAGA	51
233.	Fa	GTCACGTCAGTCCTGTAGTGCTCAGT	26
234.	Ra	TCTGCAATGTAGGCTGTACGACGAC	25
235.	Sa	GACTGACGTGACTCTGCAATG	21
236.	LTb	CTCTCTCTCGCTGACGTGCTCAGTGTCGTCGTCGTACAGCCTAAGGAGAAGA	51
237.	Fb	CTCTCTCTCGCTGACGTGCTCAGT	26
238.	Rb	TCTTCTCCTTAGGCTGTACGACGAC	25
239.	Sb	AGAGAGAGAGTCTTCTCCTTA	21
240.	LTc	CCTCTTGCTTTCGCTCTCGTTCTTTACAGAACACAGACGAGAAGAAGAACACA	51
241.	LTc comp	TGGTCTTCTTCTCGTCTGTGTTCTGTAAAGAACGAGAGCGAAAGCAAGAGG	51
242.	Fc	CCTCTTGCTTTCGCTCTCGTTCTTT	25

243.	Fc mism	CCTCTTGCTTTGGCTCTCGTTCTTT*	25
244.	Fc1	CCTCTTGCTTTCGCTCTCGTTCTp•TT**	25
245.	Fc2	CCTCTTGCTTTCp•GCTCTCGTTCTTT	25
246.	Fc3	Cp•CTCTTGCTTTCGCTCTCGTTCTTT	25
247.	Fc4	CCTCTTGCTTTCGCTCTCGTTCp•Tp•TT	25
248.	Fc5	CCTCTTGCTTTCp•GCp•TCTCGTTCTTT	25
249.	Fc6	CCTCTTGCTTTCGCTCTCGTTp●Cp●Tp●TT	25
250.	Fc7	CCTCTTGCTTTCp•Gp•Cp•TCTCGTTCTTT	25
251.	Fc8	CCTCTTGCTp•TTCp•GCp•TCTCGTTCTTT	25
252.	Fc9	Cp•Cp•Tp•CTTGCTTTCGCTCTCGTTCTTT	25
253.	Rc	TGGTCTTCTCGTCTGTGTTCTGT	26
254.	Rc mism	TGGTCTTCTTGTGTGTTCTGT*	26
255.	Rc1	TGGTCTTCTCGTCTGTGTTCTp•GT**	26
256.	Rc2	TGGTCTTCTTCTp•GTCTGTGTTCTGT	26
257.	Rc3	Tp•GGTCTTCTCGTCTGTGTTCTGT	26
258.	Rc4	TGGTCTTCTCGTCTGTGTTCp•Tp•GT	26
259.	Rc5	TGGTCTTCTTCp•GTp•CTGTGTTCTGT	26
260.	Rc6	TGGTCTTCTCGTCTGTGTTp•Cp•Tp•GT	26
261.	Rc7	TGGTCTTCTTCp●Gp●Tp●CTGTGTTCTGT	26
262.	Rc8	TGGTCTTCTTp●CTCp●GTp●CTGTGTTCTGT	26
263.	Rc9	Tp•Gp•Gp•TCTTCTCGTCTGTGTTCTGT	26

264.	Sc	AAAGCAAGAGGTGGTCTTCTTC	22
265.	LTd	AGGAGAAGACTGCTGACGTGCTCAGTGTCGTCGTACAGCCTACTCTTCCTC	51
266.	Fd	AGGAGAAGACTGCTGACGTGCTCAGT	26
267.	Rd	GAGGAAGAGTAGGCTGTACGACGAC	25
268.	Sd	AGTCTTCTCCTGAGGAAGAGTA	22
269.	LTe	ATTATTAGACTGCTGACGTGCTCAGTGTCGTCGTACAGCCTACGCTGCCGC	51
270.	Fe	ATTATTAGACTGCTGACGTGCTCAGT	26
271.	Re	GCGGCAGCGTAGGCTGTACGACGAC	25
272.	Se	CAGCAGTCTAATAATGCGGCAGCG	24
273.	LTf	CTGCCGCGACTGCTGACGTGCTCAGTGTCGTCGTACAGCCTACGATTATTA	51
274.	Ff	CTGCCGCGACTGCTGACGTGCTCAGT	26
275.	Rf	TAATAATCGTAGGCTGTACGACGAC	25
276.	Sf	TCGCGGCAGTAATAATCGTAG	21
277.	LTg	CAGACGTCAGTCCTGTAGTGCTCAGTGTCGTCGTACAGCCTACATTGCAGA	51
278.	Fg	CAGACGTCAGTCCTGTAGTGCTCAGT	26
279.	Rg	TCTGCAATGTAGGCTGTACGACGAC	25
280.	LTk	DMT-ACTGTCAGTCCTGTAGTGCTCAGTGTCGTCGTACAGCCTACATTGTCAGT-FAM***	50
281.	Fk	DMT-ACTGTCAGTCCTGTAGTGCTCAGTG***	25
282.	Rk	DMT-ACTGACAATGTAGGCTGTACGACGA***	25
283.	LTm	ACTGTCAGTCCTGTAGTGCTCAGTGTCGTCGTACAGCCTACATTGTCAGT	50
284.	Fm	ACTGTCAGTCCTGTAGTGCTCAGTG	25

285.	Rm	ACTGACAATGTAGGCTGTACGACGA	25
286.	LT Sm	GGACTGACAGTACTGACAATGT	22

* жирным курсивом выделены нуклеотиды, некомплементарные матрице.

** р● – фосфорилгуанидиновая модификация.

*** жирным шрифтом выделены DMT- и FAM-группы.

NºNº	Шифр	Последовательность, 5'→3'	Размер ампликона, п.о.	Организм (номер в Генбанке)	
287.	TC F	TCGTGACTCCTTTCTTGCGA	265	Липа сердцевидная	
288.	TC R	CCTACGGGAGGCCATTTTCC		(KF897521)	
289.	HA F	GCACGAGATGTGCCAAGGAA	88	Подсолнечник однолетний	
290.	HA R	CAAAGAAGCCACGAACAGCG		(KF767534)	
291.	FE F	CGAAACACCAAGTACGGCG	90	Гречиха посевная (АВООО330)	
292.	FE R	CGGGACGCGCTTCTGTTC		The links hoteblies (110000000)	
293.	FT F	TGTGTTGAGTGGCGGTTCTA	206	Гречиха татарская (КС571237)	
294.	FT R	CGGATTCATCATACTCGCTCTTG			
295.	FS F	CTAAACGGGCGGACGAGG	108	Гречиха Fagopyrum statice	
296.	FS R	CGGGACGCGCTTCTGTTC		(AB000338)	
297.	AA F	CCTTGTCGTGCGGTTGG	139	Дягиль лекарственный	
298.	AA R	GAGTGTGTGCTGCCTAAGG		(EF590754)	

Таблица 2.7. Праймеры, использованные для определения ботанического происхождения меда.

299.	MO F	GACGACTCGTGCGTTCTCCT	110	Донник лекарственный
300.	MO R	AACACCGTCTCCGATGCAATG		(KJ999360)
301.	FU F	CCCACCTTCTCTTCTCTTTC	140	Таволга вязолистная
302.	FU R	ACGCACACGACAGGC	149	(FUU90783)
303.	5,8 F	AACGACTCTCGGCAACGG	73	Универсальный
304.	5,8 R	TCACACCAAGTATCGCATTTCGCT		(растительный)

Таблица 2.8. Олигонуклеотиды, использованные для обнаружения РНК коронавируса SARS-CoV-2.

NºNº	Шифр	Последовательность, 5'→3'	Длина, нт
305.	sc2 F1	CTAGTTATCAGACTCAGACTAATTCTCCTC	30
306.	sc2 F2	GTTTAATAGGGGCTGAACATGTCAACAAC	29
307.	sc2 R	GACTAGCTACACTACGTGCCC	21
308.	srs-F	GTTATCAGACTCAGACTAATTCTCCTCGG	29
309.	srs-R	AATGATGGATTGACTAGCTACACTACGTG	29
310.	F-S1	GTTATCAGACTCAGACTAATTCTCCTC	27
311.	R-S1	TTGACTAGCTACACTACGTGCCC	23
312.	F-S2	GTCACAGACTCAGACTAATTCTCCTC*	26
313.	R-S2	TGACTGACTAGCTACACTACGTGCCC	26
314.	Qt	GTTaucagacucagacuaauucuccucggcgggcacguaguguagcuaguCAA**	53
315.	F-N	TGACGCTTCAGCGTTCTTCGGAATGTC	27

316.	R-N	GTCAAGGTGTGACTTCCATGCCAATG	23
317.	F-O	TGACAAAAGTATTCTACACTCCAGGGAC	28
318.	R-O	GTCAAAATGACTCTTACCAGTACCAGGTG	27
319.	sc2 F3 L	GAAGTCCCTGTTGCTATTCATGCAGAT	27
320.	sc2 B3 L	TTGACTAGCTACACTACGTGCCC	23
321.	sc2 FIP L	CCTATTAAACAGCCTGCACGTGTTTGTACTCCTACTTGGCGTGTTTATTCTAC	53
322.	sc2 BIP L	CCGATGAGACTTAGTCTGAGTCTGATACTCATATGAGTGTGACATACCCATTG	53
323.	sc2 F3 N	CAGAAGTCCCTGTTGCTAT	19
324.	sc2 B3 N	CGATGAGACTTAGTCTGAGT	20
325.	sc2 FIP N	TGCACGTGTTTGAAAAACATTAGAATCATGCAGATCAACTTACTCC	46
326.	sc2 BIP N	GGCTGTTTAATAGGGGCTGAATATCTGATAACTAGCGCATATACCTG	47
327.	sc2 F3 P	CAGAAGTCCCTGTTGCTAT	19
328.	sc2 B3 P	GGATTGACTAGCTACACTACG	21
329.	sc2 FIP P	GCCTGCACGTGTTTGAAAAACACATGCAGATCAACTTACTCC	42
330.	sc2 BIP P	AATAGGGGCTGAATATGTCAACAACTCTGAGTCTGATAACTAGCG	45
331.	srs-F3	GCATGTGACTTATGTCCCTG	20
332.	srs-B3	TGACAATTCCTATTACAACATCA	23
333.	srs-FIP	AGGAAAGTGTGCTTTTCCATCACAAGAAAAGAACTTCACAAC	44
334.	srs-BIP	CACACACTGGTTTGTAACACAAAGCAGTTACCAGACACAAATGTG	45
			•

* жирным шрифтом выделены нуклеотиды, некомплементарные матрице.
** дезоксирибоолигонуклеотиды записаны заглавными, рибоолигонуклеотиды – строчными буквами.

NoNo	Шифр	Последовательность, 5'→3'	Длина, нт
335.	TL1	GCTGCTCACATGGGTGGTGGTTCAGGCGAC	30
336.	TL2	TGCTGGACCACCATTGGACATGGTAGGAGAAGTGGTGGCTTCAGGCGAAC	50
337.	TL3	TGCTGGACCACCATTGGACAGGTGTGGTCTCAGGCAGACATGAACAGCA AAGTGGTGGCTTCAGGCGAAC	70
338.	Р	AGTGAACATAAGGTCCAGCAGTTCGCCTGACATAGACCAA	40
339.	Pr 11	GCTGCTCACATGGGTG	16
340.	Pr 12	GTCGCCTGAACCAC	14
341.	Pr 21	TGCTGGACCACCATTGGACA	20
342.	Pr 22	GTTCGCCTGAAGCCACCACT	20
343.	Pr 31	CCTGCTAGACACTGGG	16
344.	Pr 32	CTGCCTGAGACCACAC	16

Таблица 2.9. Олигонуклеотиды, использованные для изучения циклизации ДНК.

Таблица 2.10. Олигонуклеотиды, использованные для анализа микроРНК.

NºNº	Шифр	Последовательность $5^{2} \rightarrow 3^{2}$	Размер,
	шпфр		
345.	Tae-miR159*	uuuggauugaagggagcucug**	21
346.	Tae-miR5050	uugaacgaccucaccaugucg	21
347.	Tae-miR9662a	uugaacaucccagagccaccg	21

348.	Tae-miR398-3p	uguguucucaggucgcccccg	21
349.	Tae-miR167c-5p	ugaagcugccagcaugaucugc	22
350.	Pr-159	CAGAGCTCCCTTCAATCCAAA	21
351.	Pr-5050	CGACATGGTGAGGTCGTTCAA	21
352.	Pr-9662a	CGGTGGCTCTGGGATGTTCAA	21
353.	Pr-398-3p	CGGGGGCGACCTGAGAACACA	21
354.	Pr-167c-5p	GCAGATCATGCTGGCAGCTTCA	22
355.	Adp	CTCTGACGAGAACTTGACTTCACTATGACT	30
356.	RTO	CTCTGACGAGAACTTGACTTCACTATGACTATGGCTGGCT	85
	X	GTTACTTGATCCCTAGTCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	

* последовательности миРНК взяты из базы данных миРНК https://www.mirbase.org.

** заглавные буквы – дезоксирибонуклеотиды, прописные буквы – рибонуклеотиды.

Таблица 2.11. Олигонуклеотиды прочие.

NºNº	Шифр	Последовательность, 5'→3'	Размер, нт	Назначение
357.	F-X	AGTCTCTCCCAGGTCTACTGCTCC	24	определение пола
358.	F-Y	GCATTGGAGTTTTCGAAAGACT	22	человека
359.	R-XY	CAGAGGCGAGCCTGCAGA	18	
360.	rsMD-C	CAGGGTGGTCCTGCACGACCCTCACAGACTCA CGCACCACGCAAGGGCTGGGAGACTT	57	типирование микродиплотипов
361.	rsMD-1	CCTGCACGACCCTCACAGA	19	

362.	rsMD-2	CTTGCGTGGTGCGTGAGT	18	
363.	phL-L F	ATGCTGCTGGGTGTTTATGCCTACTTTATA	30	оценка влияния углеводов
364.	phL-L R	TCAATCAGCCAGCTTTCCTCACC	23	на ПЦР
365.	phL-XL F	CTGGACACCTCCAGCCGTAAG	21	
366.	phL-XL R	ATAAGTCAGATCGGCTGAACTCCACAAG	28	

Бо́льшая часть ОДН была синтезирована самостоятельно на ДНК-синтезаторе ASM-800 (Биоссет) амидофосфитным методом. Очистку проводили методом гельэлектрофореза в 15%-ном полиакриламидном геле или с помощью ВЭЖХ в приборе LC-20AT (Shimadzu) на 25 см колонке SUPELCOSIL ABZ+Plus (Supelco), где в качестве элюента использовали градиентную смесь 0,1 М водного ацетата триэтиламмония (растворитель A) и 100%-ного ацетонитрила (растворитель B). Концентрацию ОДН определяли по оптической плотности водного раствора, найденной при 260 нм на спектрофотометре BioSpec-M*ini* (Shimadzu). Часть ОДН синтезирована в НПК "Синтол". Праймеры, содержащие фосфорилгуанидиновую модификацию (ФГ), получены в ИХБФМ СО РАН.

2.3. Выделение НК

При выполнении исследований использовали тотальную ДНК, выделенную из биоматериалов следующих организмов: ели сибирской (Picea obovata), сосны обыкновенной (Pinus sylvestris), лиственницы Сукачева (Larix sukaczewii), дуба обыкновенного (Quercus robur), липы сердцевидной (Tilia cordata), пчелы медоносной (Apis mellifera), богомола обыкновенного (Mantis religiosa), человека (Homo sapiens), из объектов биологического происхождения: почвы, древесной трухи, меда. Также использовали ДНК фага Лямбда (TFS), микроРНК мягкой пшеницы (Triticum aestivum L.), РНК коронавируса SARS-CoV-2, синтетические дезоксирибо- и рибоолигонуклеотиды с искусственно сконструированными природными нуклеотидными И последовательностями. Для клонирования использовали векторы pAL2-T (Евроген) и pBlueScript KS(+). Концентрацию НК определяли по оптической плотности на спектрофотометре BioSpec-mini (Shimadzu) или Nanodrop (TFS).

Выделение ДНК растений

ДНК хвойных растений (ель, сосна, лиственница), а также дуба и липы получали ЦТАБ-методом согласно [Doyle, 1987] с небольшими изменениями. Навеску кусочков хвои или листьев массой около 50 мг измельчали растиранием в жидком азоте, переносили в пробирку типа eppendorf объемом 2 мл и добавляли 400 мкл ЦТАБ-буфера, 2 мкл РНКазы А с концентрацией 10 мг/мл и, тщательно перемешав на вортексе, инкубировали при 65°C в течение 80 мин, периодически взбалтывая. Далее добавляли 400 мкл смеси хлороформ-изоамиловый спирт (23:2 об.), перемешивали на вортексе 1 мин и центрифугировали 1 мин при 7500 g. Верхнюю фазу осторожно отбирали, переносили в

чистую пробирку и еще дважды повторяли очистку смесью хлороформ-изоамиловый спирт. К водной фазе приливали 350 мкл изопропанола и тщательно перемешивали, не допуская энергичного встряхивания. Затем образцы выдерживали 30 мин при -20°С, центрифугировали 10 мин при 6500 g, супернатант аккуратно сливали. Осажденную ДНК промывали 100 мкл 70%-ного этанола, центрифугировали 5 мин при 6500 g, спирт сливали и сушили осадки в вакуумном концентраторе модели 5301 (Eppendorf). Далее осадки ДНК растворяли в 50 мкл 1× ТЕ-буфера и хранили при -20°С. ДНК лиственницы выделяли из хвои с помощью набора GeneJET (TFS) согласно протоколу производителя.

Выделение ДНК из древесной трухи

ДНК из трухи была выделена ЦТАБ-методом с некоторыми модификациями [Doyle, 1987]. Труха была извлечена из нижнего бревна дома, построенного в 1914 г. Биоматериал растирали в ступке с жидким азотом до порошкообразного состояния, не допуская его размораживания. Затем его переносили в предварительно охлажденную микроцентрифужную пробирку и выдерживали на холоду несколько минут (оставив в жидком азоте на 2-3 мин), добавляли равный объем (по отношению к исходной навеске растительного материала) горячего (65°C) 2[×] ЦТАБ-буфера, содержащего 2%-ный ЦТАБ, 100 мМ Трис-HCl (pH 8,0), 20 мМ ЭДТА (pH 8,0), 1%-ный поливинилпирролидон и 1,4 М NaCl. Затем образец инкубировали при 65°С в течение 2 мин, поместив пробирку в термостат Термит (ДНК-Технология). Далее постепенно в течение 5 мин добавляли 1 объем смеси хлороформ-изоамиловый спирт (24:1), тщательно перемешивали до образования однородной эмульсии. Смесь расслаивали центрифугированием при 5400 g в течение 30 с в центрифуге CM-50 (Elmi). Верхний водно-солевой слой, содержащий нуклеиновые кислоты, отбирали пипеткой и переносили в чистую микроцентрифужную пробирку, добавляли 1/5 объема 5% раствора ЦТАБ и, тщательно перемешав, повторяли экстракцию. Полученный раствор далее очищали с помощью спин-колонок производства фирмы Corning.

Выделение ДНК из меда

В качестве источника ДНК использовали образцы различных сортов мёда, собранного в частных пчеловодческих хозяйствах Республики Башкортостан. Выделение ДНК осуществляли следующим образом. Навеску мёда массой 7,5 г растворяли в 40 мл дистиллированной воды в течение 1 ч при комнатной температуре и постоянном перемешивании. Далее центрифугировали 30 мин при 1100 g, осадок ресуспензировали в 1 мл воды, переносили в новую центрифужную пробирку и осаждали 5 мин при 10000 g.

Дальнейшее выделение ДНК проводили двумя разными способами. По способу №1, полученный осадок заливали 100 мкл 2М NaCl и подвергали облучению ультразвуком в режиме "high" в течение 30 мин. Далее из полученной смеси выделяли ДНК с помощью набора "Сорб-ГМО-Б" (Синтол) в соответствии с рекомендациями производителя. По способу №2, ДНК выделяли сразу из осадка с помощью набора "Сорб-ГМО-Б" (Синтол).

Выделение ДНК из почвы

Для выделения "почвенной" ДНК забор материала-источника осуществляли следующим образом. Под кроной ели сибирской (возраст около 20 лет), растущей в черте г. Уфы, на расстоянии около 30 см от ствола тщательно расчищали от опавшей хвои до почвенного слоя площадку диаметром 10 см, забирали почвенный керн протыканием почвы металлической трубкой диаметром 2 см на глубину 7-10 см. Затем в условиях лаборатории взятую почву сушили при 37°С 2 дня, далее растирали в ступке для создания массы, однородной по составу. Суммарную ДНК извлекали солевым методом [Miller et al., 1988]. Для этого к навеске почвы массой 0,2 г добавляли 400 мкл солевого буфера (0,4 М NaCl, 10 мМ Трис-HCl (pH 8,0), 2 мМ ЭДТА), 40 мкл 20% ДДС и 8 мкл протеиназы К с концентрацией 20 мг/мл. После тщательного перемешивания образцы инкубировали 2 ч при 65°С, затем добавляли 300 мкл 5М NaCl, тщательно перемешивали на вортексе в течение 30 с и центрифугировали 30 мин при 6500 g. Супернатант переносили в чистую пробирку и добавляли равный объем изопропанола, тщательно перемешивали и инкубировали при -20°C в течение 1 ч. Далее образцы центрифугировали 20 мин при 6500 g, осадок дважды промывали 500 мкл 70%-ного этанола, сушили в вакуумном концентраторе модели 5301 (Eppendorf) и растворяли в 50 мкл 1× ТЕ-буфера. Полученную таким образом ДНК очищали дополнительно с помощью набора для выделения ДНК из агарозного геля и реакционных смесей (Цитокин). Очищенную ДНК хранили при -20°С.

Выделение ДНК человека

Выделение ДНК осуществляли методом последовательной фенольнохлороформной экстракции из цельной периферической крови и клеток линии Jurkat [Mathew, 1985]. Выделение ДНК проводили прибавлением к 8-10 мл крови (или к 1 мл клеточной суспензии) 50 (5) мл лизирующего буфера, содержащего 320 мМ сахарозы, 1% Triton X-100, 5 мМ MgCl₂, 10 мМ Трис-HCl (pH 7,6). Полученную смесь перемешивали и центрифугировали при 4°C, 700 g в течение 20 мин. Надосадочную жидкость сливали, к осадку добавляли 8 (1) мл раствора, содержащего 25 мМ ЭДТА (pH 8,0) и 75 мМ NaCl, ресуспензировали, добавляли 0,8 мл 10% ДДС, 50 мкл протеиназы К (10 мг/мл) и инкубировали образец при 37°С в течение 16 ч. После этого к лизату добавляли 0,5 мл 5 М перхлората натрия и последовательно экстрагировали ДНК равными объемами фенола, смеси фенол-хлороформ (1:1) и хлороформа с центрифугированием при 700 g в течение 10 мин и отбором водной фазы после каждого этапа. ДНК осаждали из раствора добавлением двух объемов охлажденного 96%-ного этанола. Осадок ДНК растворяли в 200 мкл 1[×] ТЕ-буфера и хранили при -20°С.

Выделение ДНК пчелы и богомола

ДНК пчелы медоносной и богомола обыкновенного выделяли из мышечной ткани насекомых с помощью коммерческого набора "ДНК-Экстран-2" (Синтол).

Получение препаратов РНК коронавируса SARS-CoV-2

Генетический материал коронавируса SARS-CoV-2 был представлен лизатами назофарингеальных мазков, взятых у больных COVID-19 (N=100) с использованием набора для выделения М-Сорб-ООМ-96 (Синтол). Выделение РНК SARS-CoV-2 осуществлялось в ООО "ИЦ "Лаборатория" сотрудниками, имеющими допуск к работе с Диагноз COVID-19 был подтвержден ими методом ОТ-ПШР патогенами. с использованием набора для детекции OT-ПЦР-SARS-CoV-2 (Синтол). Также использовались экстракты мазков из носоглотки с сомнительными (N=50) или отрицательными (N=50) результатами ПЦР на SARS-CoV-2. Путём смешивания 20 соответствующих лизатов объёмом 30 мкл каждый были получены четыре типа образцов Rmix: Rmix(+) (SARS-CoV-2-положительные), Rmix(?) (SARS-CoV-2-сомнительные), Rmix(-) (SARS-CoV-2-отрицательные) и Rmix(H) (от здоровых индивидов).

Выделение микроРНК

МиРНК выделяли из растений мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.). Были взяты два сорта: Омская 35 и Казахстанская 10. Проростки выращивали в 10% растворе Хоугланда-Арнона в климатокамере КС-200 СПУ (Россия) при температуре 20/24°С (ночь/день) с 16-часовым фотопериодом, затем заражали *Septoria nodorum*. Изоляты *S.nodorum* содержались на картофельно-глюкозном агаре при 21°С в условиях 12-часового фотопериода. 6-дневные проростки пшеницы опрыскивали суспензией спор *S.nodorum* в 0,02% растворе Tween 20 (10⁶ спор/мл). Контрольные (здоровые) сеянцы опрыскивали 0,02% Тween 20. Затем сосуды с проростками закрывали и переносили в ростовую камеру с контролируемыми условиями. Развитие симптомов заражения наблюдали на отделенных листьях в чашках Петри. Области поражения регистрировали с помощью камеры SP-

800UZ (Olympus) на шестые сутки. Для каждого эксперимента выполняли три биологических повтора. МиРНК выделяли из 100 мг тканей листа с помощью набора для выделения миРНК (Биолабмикс).

2.4. Подготовка препаратов НК

Часть амплификационных экспериментов проводили использованием с разрушенных или специально подготовленных препаратов НК. Разрушение НК проводили четырьмя различными способами: ультразвуковой обработкой, ультрафиолетовым облучением, действием кислоты. Растворы с разрушенными НК использовали для Ряд амплификации без дополнительной очистки. НК-препаратов подвергали ферментативным превращениям.

Разрушение ДНК под действием ультразвука

Фрагментацию ДНК осуществляли в приборе BioRuptor (Diagenode), облучая дегазированные водные растворы в тонкостенных пробирках типа eppendorf объемом 0,6 мл. Облучение ультразвуком проводили в трех возможных для прибора режимах работы: слабого ("low", мощность 160 Вт), среднего ("medium", 200 Вт) или интенсивного воздействия ("high", 320 Вт), с интервалом 1 мин озвучивания и 0,5 мин охлаждения во льду с общей продолжительностью от 4 до 90 мин в зависимости от эксперимента. Все образцы для ультразвукового дробления ДНК были представлены трехкратными повторами, которые впоследствии объединяли для получения однородного препарата ДНК. Результаты фрагментации визуализировали методом гель-электрофореза (п. 2.6).

Для оценки влияния условий среды на характер ультразвукового дробления ампликонов фрагментацию проводили в растворах 2 М хлорида натрия, 50%-ного этанола и 30%-ного формамида в режиме "high". Фрагментацию тотальной ДНК для последующей количественной ПЦР проводили в 50 мкл растворов, содержавших 10⁴ или 10⁵ стартовых копий мишени в 1 мкл образца.

Разрушение ДНК под действием ультрафиолета и кислоты

Для разрушения ДНК ультрафиолетом 10 мкл водного раствора тотальной ДНК пчелы с концентрацией 50 нг/мкл помещали на крышку открытой полипропиленовой пробирки типа eppendorf объемом 0,6 мл и выдерживали под открытой УФ-лампой ПЦРбокса UVC/T-M-AR (Biosan) (интенсивность УФ-излучения 15 мВт/см²/с) в течение 20 мин. Разрушение ДНК кислотой проводили, добавляя 1,0 мкл ледяной уксусной кислоты к 10 мкл тотальной ДНК пчелы с концентрацией 50 нг/мкл, смесь выдерживали 3 мин и сразу вносили 5 мкл концентрированного (27%) водного аммиака. Далее избыток аммиака удаляли в концентраторе 5301 (Eppendorf), ДНК переосаждали 70%-ным этанолом, осадок сушили и растворяли в воде.

Получение препарата разрушенной РНК

Образец разрушенной РНК – Rmix(+) – был приготовлен путем смешивания 20 лизатов от SARS-CoV-2-положительных пациентов объемом 30 мкл каждый. Полученную смесь делили на 5 аликвот с последующим 2-, 5-, 10- или 20-кратным замораживанием при -20°C и оттаиванием. В результате были получены образцы Rmix0 (без замораживания), Rmix2, Rmix5, Rmix10 и Rmix20 соответственно.

Метилирование тотальной ДНК

Метилирование ДНК фага Лямбда проводили in vitro следующим образом. Реакционную смесь общим объемом 50 мкл, которая содержала 9 мкг ДНК фага Лямбда, 10 ед. акт. СрG метилтрансферазы M.SssI, 1× буфер M.SssI и 0,05 мкМ свежеприготовленного S-аденозилметионина, инкубировали при 37°С в течение 30 мин. Далее через равные промежутки времени добавляли 0,5 мкМ S-аденозилметионин следующим образом: через 30 и 60 мин инкубации добавляли 5 мкл раствора, через 2,5 ч после начала инкубации - еще 5 мкл раствора S-аденозилметионина и 1 мкл 10× буфера для M.SssI, через 4,5 ч инкубации добавляли 10 мкл раствора S-аденозилметионина и 1 мкл 10× буфера для M.SssI. Затем смесь инкубировали в течение 15 ч при комнатной температуре с последующей инактивацией M.SssI при 65°С в течение 20 мин. Эффективность метилирования оценивали по отсутствию расщепления ДНК рестрикционной эндонуклеазой HpaII. Также был получен образец неметилированной ДНК, идентичный по способу приготовления метилированной ДНК, но содержащий инактивированную при 75°С в течение 30 мин СрG метилтрансферазу M.SssI.

Бисульфитная конверсия ДНК

ДНК из клеток линии Jurkat и лейкоцитов здоровых индивидов (мужчины, 25-35 лет) конвертировали с помощью набора для бисульфитной конверсии EpiJet (TFS) в соответствии с инструкцией (https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K1461) и использовали далее для наработки соответствующих ампликонов с помощью ПЦР с полимеразой Phusion U Hot Start (TFS) по стандартному протоколу. Продукты амплификации очищали с помощью препаративного гель-электрофореза и использовали

далее для клонирования. Образцы ДНК для технологии MethylScreen готовили согласно [Holemon et al., 2007].

Циклизация ДНК-матриц

Кольцевые матрицы (КМ) получали двумя способами в зависимости от задач: в ходе матричного или безматричного лигирования. В обоих случаях соответствующие олигонуклеотиды-предшественники LT/TL сначала фосфорилировали с помощью T4 полинуклеотидкиназы согласно протоколу производителя. Матричное лигирование вели следующим образом. Сначала LT/TL смешивали с соответствующей поддерживающей пробой S в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 1 пмоль ОДН-матрицы, 5 пмоль пробы S, 1× буфер T4 ДНК-лигазы, и проводили их отжиг в приборе T100 (Bio-Rad Laboratories), плавно снижая температуру с 80 до 25°С в течение 1 ч. После окончания отжига добавляли 2 мкл 10 мМ АТФ и 5 ед. акт. Т4 ДНК-лигазы. Смесь инкубировали 18 ч при 8°C, далее инактивировали лигазу при 75°C в течение 15 мин. Безматричное лигирование вели следующим образом. Готовили 20 мкл реакционной смеси, содержащей 10⁷-10¹⁰ копий ОДН-матрицы, 1× буфер Т4 РНК-лигазы, 1 мМ АТФ и 5 ед. акт. Т4 РНКлигазы. Смесь инкубировали 18 ч при комнатной температуре, далее инактивировали лигазу при 75°C в течение 15 мин. Далее в обоих случаях добавляли к реакционной смеси 1 ед. акт. экзонуклеазы I и ее буфер (1×), инкубировали 2 ч при 37°С и еще 1 ч при 45°С, после чего инактивировали фермент при 85°С в течение 15 мин. КМ использовали для амплификации без дополнительной очистки, разбавляя водой до необходимой концентрации (количества копий).

Приготовление ДНК-матрицы при анализе микродиплотипов проводили следующим образом. Смешивали 1 пмоль предварительно фосфорилированной С-пробы rs690-C, 30 нг УЗ-фрагментированной ДНК человека, 1^{\times} буфер ДНК-полимеразы T4, 1^{\times} буфер ДНК-лигазы T4 и доводили водой до 10 мкл. Затем смесь нагревали до 90°C и далее медленно охлаждали в течение 20 мин до 30°C в ДНК-амплификаторе T100. По завершении сразу добавляли 5 ед. акт. ДНК-полимеразы T4, 5 ед. акт. ДНК-лигазы T4, 1 мкл 10 мМ АТФ, 2 мкл смеси дНТФ с концентрацией 0,25 мМ каждый и инкубировали 2 ч при 37°C. Затем добавляли 1 ед. акт. экзонуклеазы I и ее буфер (1[×]), инкубировали 2 ч при 37°C, после чего инактивировали ферменты при 85°C в течение 20 мин. Полученные препараты ДНК использовали далее без очистки для проведения АКК.

Лигирование микроРНК с адаптором

Предварительно проводили фосфорилирование миРНК с помощью полинуклеотидкиназы Т4 в соответствии со стандартным протоколом.

Фосфорилированные миРНК лигировали с адаптором Adp в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 10^9 копий миРНК, $5 \cdot 10^{10}$ копий Adp, 5 ед. акт. Т4 РНК-лигазы, 1× буфер для Т4 РНК-лигазы. Реакционные смеси инкубировали 18 ч при комнатной температуре с последующей инактивацией лигазы при 75°C в течение 20 мин. Полученные продукты лигирования использовали для мультимеризации без дополнительной очистки. Для контрольных экспериментов такую же процедуру лигирования проводили для гетеродуплексов ДНК-РНК, полученных отжигом фосфорилированных синтетических миРНК и соответствующих праймеров.

2.5. Амплификация НК

Амплификацию нуклеиновых кислот с детекцией "по конечной точке" проводили в ДНК-амплификаторе T100 (BioRad Laboratories), в режиме реального времени в ДНКамплификаторах iQ5, CFX96 Connect, CFX96 Opus (Bio-Rad Laboratories) и LC96 (Roche). Все образцы для ПЦР готовили в ПЦР-боксе UVC/T-M-AR (Biosan), предварительно облучая рабочее пространство, автоматические дозаторы и пластиковую посуду ультрафиолетом в течение 15-20 мин (мощность лампы 25 Вт). Каждый образец был представлен в двух или трех повторах. Образцы отрицательного контроля (OK, NTC, NC) не содержали НК, но содержали все остальные компоненты соответствующих реакционных смесей.

Реакционные смеси имели объем 5-100 мкл и содержали компоненты, вид и количество которых варьировали в зависимости от эксперимента. Базовая смесь содержала ДНК-матрицу, праймеры в концентрации 0,5 мкМ, 2,5 ед. акт. ДНК-полимеразы, дНТФ с концентрацией 0,25 мМ каждый, 1× буфер для ДНК-полимеразы. При постановке амплификации в реальном времени смеси содержали дополнительно интеркалирующие красители SYBR Green I, dsGreen или EvaGreen; концентрация красителей варьировала в зависимости от эксперимента. В ПЦР-экспериментах, требовавших наработки препаративных количеств продуктов амплификации, реакцию проводили в 30 мкл смеси.

В экспериментах по оценке количества доступных для амплификации мишеней количество ДНК находили с помощью калибровочных кривых. Анализ полученных результатов осуществлялся с помощью встроенного пакета программ. Количественная оценка проводилась с помощью C(t)-метода, при этом базовая линия определялась автоматически или вручную.

2.5.1. Амплификация в режиме термоциклирования

Использовали разные температурные программы в зависимости от эксперимента, варьируя температуру и продолжительность этапов амплификации. Базовая (стандартная) программа термоциклирования состояла из следующих этапов: начальная денатурация при 94°C (3 мин), 30-40 циклов – денатурация при 94°C (10 с), отжиг 50-65°C в зависимости от праймеров (15 с), элонгация при 72°C (15 с). В экспериментах по определению оптимального временно́го режима ПЦР со сближенными праймерами варьировали продолжительность денатурации, отжига и элонгации. В экспериментах по определению оптимального температурного режима ПЦР проводили в градиентном режиме работы амплификатора. При постановке ПЦР в реальном времени принимали во внимание наличие в реакционной смеси интеркалирующего красителя и корректировали продолжительность этапов отжига и элонгации: начальная денатурация при 94°C (3 мин), 30-40 циклов – денатурация при 94°C (10 с), отжиг 50-65°C в зависимости от праймеров (30 с), элонгация при 72°C (40 с). При использовании полимераз "горячего старта" продолжительность этапа начальной денатурации увеличивали до 6 мин.

В отдельных случаях обнаружение ДНК, выделенной из некоторых объектов, проводили путем кратной амплификации (реамплификации), а в реакционную смесь добавляли увеличенное в 5 раз количество ДНК-полимеразы (12,5 ед. акт.).

Конвекционную ПЦР (конвПЦР) проводили в стандартных ПЦР-пробирках объемом 200 мкл, в 20-100 мкл реакционной смеси, содержавшей 1× буфер для ДНК-полимеразы Taq (68 мМ Трис-HCl pH 8,8, 2.0 мМ MgCl₂, 18 мМ (NH₄)₂SO₄ и 0,01% Tween 20), 2,5 ед. акт. ДНК-полимеразы Taq, 5,0 пмоль каждого праймера, 1,0 мкл смеси дНТФ (по 2,5 мМ каждого) и 3 нг ДНК пчелы медоносной на каждые 10 мкл реакционного объема. КонвПЦР проводили в экспериментальной установке собственной разработки. Температура внешних нагревательных элементов была установлена на 145°C и 0°C соответственно, что соответствует 95°C и 55°C внутри пробирки вблизи точек приложения этих элементов.

Детекцию РНК коронавируса SARS-CoV-2 с помощью конвПЦР проводили следующим образом. Реакционные смеси объемом 50 мкл содержали 1 мкл экстракта мазков из носоглотки пациентов с COVID-19, по 5 пмоль каждого праймера (srs-F и srs-R), 1 мкл 2,5 мМ дНТФ, $1 \times$ буфер для ДНК-полимеразы Phire HotStart, $1 \times$ буфер обратной транскриптазы MMLV, $1 \times$ интеркалирующий краситель dsGreen, 0,2 мкл раствора ДНК-полимеразы Phire Hot Start и 20 ед. акт. обратной транскриптазы MMLV на каждые 10 мкл реакционного объема. Сначала образцы выдерживали 10 мин при 37°С, затем проводили конвПЦР, как описано выше.

Обнаружение РНК коронавируса SARS-CoV-2 с помощью классической ПЦР проводили следующим образом. Реакционные смеси объемом 20 мкл содержали по 2,5 или 5 пмоль каждого праймера, 1 или 2 мкл 2,5 мМ дНТФ, 1× полимеразный буфер, 0,1, 0,5 или 1× интеркалирующий краситель dsGreen, 0,2, 1,0 или 2,0 мкл ДНК-полимеразы Hemo KlenTaq или 2 ед. акт. ДНК-полимеразы Taq-Synta. В некоторых экспериментах реакционные смеси содержали 10 ед. акт. обратной транскриптазы MMLV-Synta и ее буфер (0,5×). Тестовые образцы содержали 1 мкл экстрактов мазков из носоглотки пациентов с COVID-19. Тестировали три программы термоциклирования. Программа I: 1) условный этап обратной транскрипции (OT) – 42°C в течение 10 мин; 2) термоциклирование – 95°C 5 с, 60°C 15 с, 68°C 5 с (>30 циклов). Программа II: 1) условный этап OT – 42°C в течение 10 мин; 2) термоциклирование – 95°C 5 с, 60°C 15 с, 68°C 5 с (>30 циклов). Программа III: 1) условный этап OT – 42°C в течение 10 мин; 2) термоциклирование – 95°C 5 с, 60°C 15 с, 68°C 5 с (>30 циклов). Программа III: 1) условный этап OT – 42°C в течение 10 мин; 2) термоциклирование – 95°C 5 с, 60°C 15 с, 68°C 5 с (>30 циклов). Программа III: 1) условный этап OT – 42°C в течение 10 мин; 2) термоциклирование – 95°C 5 с, 60°C 15 с, 68°C 5 с (>30 циклов). Программа III: 1) соловный этап OT – 42°C в течение 10 мин; 2) термоциклирование – 85°C 5 с, 60°C 15 с, 68°C 5 с (>30 циклов). Программа III: 1) соловный этап OT – 42°C в течение 10 мин; 2) термоциклирование – 85°C 5 с, 60°C 15 с, 68°C 5 с (>30 циклов). Все три программы содержали пять предварительных циклов без регистрации сигнала ("слепые" циклы), которые состояли из следующих этапов: 95°C – 10 с, 60°C – 20 с, 68°C – 10 с.

При оценке влияния углеводов на ПЦР реакционные смеси объемом 20 мкл содержали 3 нг ДНК богомола обыкновенного или человека (10⁴ копии мишени на реакцию), 5 пмоль каждого праймера, 0-10% углевода или ДМСО, 5 ед. акт. ДНК-полимеразы, 1× SYBR Green I или 8,0 мкл 2,5× ПЦР-мастермикса с интеркалирующим красителем EvaGreen (Синтол).

Количественную оценку микроРНК пшеницы с помощью ПЦР проводили следующим образом. Полиаденилированные миРНК получали по методике, описанной в [Gupta et al., 2012]. ПЦР-реакционные смеси объемом 20 мкл содержали по 5 пмоль каждого праймера (Adp и RTQ), 0,25 мМ дНТФ, 2 ед. акт. ДНК-полимеразы Нето KlenTaq, 1× полимеразный буфер, 1× dsGreen и 1 мкл препаратов полиаденилированных миРНК. Программа ПЦР состояла из следующих этапов: 1) 50°С (10 мин); 2) денатурация при 95°С (3 мин); 3) 40 циклов денатурации при 95°С (15 с), отжига при 60°С (40 с) и элонгации при 72°С (30 с).

2.5.2. Изотермическая амплификация

Изотермическую амплификацию проводили только в режиме реального времени. Использовали разные температурные программы в зависимости от эксперимента, варьируя температуру и продолжительность этапов реакции. Базовая программа для полимеразы Bst exo- состояла из следующих этапов: 68°C (30 с), 65°C (мин), 60°C (210 мин). Отдельные эксперименты проводились в градиентном режиме (диапазон температуры 40-65°С для третьего этапа).

Реакции мультимеризации и амплификации "катящимся кольцом" вели в 5-30 мкл реакционной смеси, содержащей 10^{1} - 10^{12} копий линейной или 10^{6} - 10^{7} копий кольцевой матрицы, по 5 пмоль каждого праймера, 0,25 мМ дНТФ, 1× полимеразный буфер, 0,8-16 ед. акт. ДНК-полимеразы. Использовали полимеразы с цепь-вытесняющей активностью: Bst Large Fragment, Bst 2.0, Bst 2.0 WarmStart, Bst 3.0, Vent exo-, 9°Nm, Hemo KlenTaq, Bsm, Bsu, phi29 и соответствующие им буферы. В некоторых экспериментах использовали нетипичные сочетания полимераз и буферов, буферы собственного приготовления (Thermopol-C, Isothermal-C, Isothermal II-C, Taq-C, Taq-ME, пользовательские буферы 1 и 2), варьировали вид и концентрацию катиона двухвалентного металла, концентрацию интеркалирующего красителя.

В экспериментах по изучению механизма мультимеризации реакционные смеси содержали дополнительно 0,01, 0,05 или 0,1% масс. препаратов полиаспарагиновой кислоты pAspI, pAspII, pAspIII, предоставленные коллегами из Казанского Федерального (Приволжского) Университета, или аспартата натрия, соответственно. Программа амплификации состояла из следующих этапов: 1) 70° C – 30 c, 2) 60° C – 4 ч для полимеразы Bst 2.0, и 1) 95° C – 30 c, 2) 60° C – 1 мин и 3) 68° C – 4 ч для полимеразы Vent ехо-. При определении миPHK реакционные смеси содержали дополнительно 10 мМ ДТТ.

LAMP-амплификацию проводили как описано в [Oscorbin et al., 2016], с небольшими изменениями. Образцы объемом 20 мкл содержали 2 мкл 10× буфера Isothermal II, 2 мкл 2,5 мМ дНТФ, 3,0 ед. акт. ДНК-полимеразы Bst 3.0, 1,6 мкМ праймеры srs-FIP и srs-BIP, 0,2 мкМ srs-F3 и srs-B3, 0,5× SYBR Green I. Тестовые образцы содержали 1 мкл экстрактов мазков из носоглотки пациентов с COVID-19. В экспериментах по повышению специфичности LAMP с помощью pAsp реакционные смеси содержали 0,01% полиаспарагиновой кислоты.

В экспериментах по оценке влияния ДТТ и 2-МЕ на эффективность ММ использовали препарат искусственно "состаренной" ДНК-полимеразы Bst 2.0. Для его приготовления аликвоту коммерческого реагента объемом 50 мкл помещали в микроцентрифужную пробирку на 0,6 мл и далее в течение 10 рабочих дней выдерживали пробирку в открытом состоянии в морозильнике (-20°С) три раза по 10 мин каждый день. Подготовленный таким образом препарат полимеразы использовали для проведения изотермической амплификации по методикам, описанным выше, с тем отличием, что амплификационные образцы содержали дополнительно 1, 5, 10 или 30 мМ ДТТ, или 2, 10 или 20 мМ 2-МЕ. Часть таких образцов была приготовлена путем добавления смесей

ДНК-полимеразы Bst 2.0 с ДТТ или 2-МЕ, выдержанных в течение 0, 0,5, 1, 2 и 4 ч после смешивания данных реагентов.

2.6. Гель-электрофорез

Аналитический гель-электрофорез

Электрофорез препаратов ДНК после ультразвуковой фрагментации и продуктов амплификации проводили с использованием 1%-ного агарозного или 10-15%-ных полиакриламидных гелей в камерах горизонтального (HE-10) или вертикального (VE-10, Mini-Protean) типов (Хеликон, Bio-Rad Laboratories) при напряжении 90-110 В. Источником питания служил прибор "Эльф-4" (ДНК-технология). В качестве буферной системы использовали ТАЕ-буфер. Для нанесения препаратов ДНК в гель использовался водный раствор, содержавший 0,25% бромфенола синего, 0,25% ксиленцианола и 30% глицерина. Для определения размера фрагментов ДНК использовали ДНК-маркеры O'GeneRuler 10-300 п.о. и 100 п.о. (TFS), 50 bp DNA и Low molecular weigth DNA (NEB), pUC19/MspI (СибЭнзим). После окончания электрофореза гели окрашивали бромистым этидием (5 мкг/мл) в течение 10 мин. Флуоресценцию регистрировали при помощи фотодокументационных систем Gel Camera System (UVP Inc.) или GelDoc XP (Bio-Rad Laboratories). Количественную оценку интенсивности полос в гелях проводили методом денситометрии электрофореграмм с помощью программы TotalLab 1.10.

Препаративный гель-электрофорез

Для выделения продуктов амплификации использовали препаративный гельэлектрофорез [Sambrook, Rassel, 2006b]. Элюцию фрагментов ДНК проводили двумя способами. По первому способу, вырезали соответствующие участки геля, несущие ДНК нужного размера, и помещали их в пробирки типа эппендорф объемом 2 мл. Тщательно раздробив гель тефлоновым пестиком, добавляли 300 мкл насыщенного раствора перхлората лития и, встряхнув на вортексе, оставляли на ночь при +4°С. Далее раствор центрифугировали 1 мин при 4500 g, супернатант переносили в чистые пробирки типа эппендорф объемом 2 мл, добавляли 4-хкратный объем ацетона и оставляли на 3 ч при -20°С. После этого образцы центрифугировали 15 мин при 10000 g, супернатант отбирали, а осадок растворяли в 20 мкл 1× ТЕ-буфера и хранили при -20°С. По второму способу, вырезали соответствующие участки агарозного геля и выделяли из них ДНК с помощью набора реагентов производства "Цитокин".

2.7. Секвенирование ДНК

Нуклеотидные последовательности продуктов амплификации определяли следующим образом. Некоторые амплификаты предварительно очищали методом препаративного гель-электрофореза, часть использовали без очистки непосредственно после амплификационных экспериментов. Ампликоны клонировали в векторе pAL2-T (Евроген) или pBlueScript KS(+) в компетентных клетках *E. coli* XL1-Blue. Реакцию лигирования проводили в соответствии со стандартным протоколом. Плазмидную ДНК выделяли с помощью Chelex-буфера (Bio-Rad Laboratories) и проверяли наличие целевой вставки. Для клонов со вставкой проводили ПЦР-наработку соответствующих ампликонов, которые далее секвенировали с использованием технологии ABI Big Dye Terminator в приборе 3500 Genetic Analyzer самостоятельно или в компании "Евроген". В отдельных случаях продукты мультимеризации, а также продукты АКК, полученные при анализе микродиплотипов, секвенировали в приборе MiSeq в компании "Синтол".

2.8. Молекулярное моделирование и докинг

Молекулярный докинг проводили с использованием пакета программ Schrodinger Suite 2016-4. Для докинга из базы данных белков (PDB) были взяты три различные структуры ДНК-полимеразы Bst exo-: 1L3S ("открытая"), 2HVI ("полузакрытая") и 1LV5 ("закрытая"). Молекулярные структуры ДНК-полимеразы были дополнительно подготовлены для расчетов с использованием программы Protein Preparation Wizard [Sastry et al., 2013]. Все несоответствия, такие как отсутствующие атомы водорода, порядок связей и неправильная ориентация функциональных групп боковых цепей были устранены с помощью этой процедуры. Молекулы воды в активном центре, а также молекулы ДНК и дЦТФ не подвергались изменениям. Четвертичные комплексы "полимераза-ДНК-трифосфат-катионы" рассчитывали с помощью модуля Glide Docking [Friesner et al., 2004, 2006; Halgren et al., 2004]. Моделирование проводилось с катионами Ca²⁺, Cd²⁺, Co²⁺, Cu²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Ni²⁺ и Zn²⁺, помещенными в позиции А и В исходной структуры Bst exo-, и дальнейшая оптимизация структуры проводились в модуле Protein Preparation Wizard. Одноцепочечные тринуклеотиды (sst) и тринуклеотидные дуплексы (dst) моделировали с помощью Discovery Studio v.4.1 с последующей подготовкой для дальнейших расчетов с помощью модуля LigPrep.

2.9. Базы данных и программное обеспечение

Геномные нуклеотидные последовательности были взяты из баз данных (БД) NCBI (Генбанк) [https://www.ncbi.nlm.nih.gov] и Ensembl [https://www.ensembl.org/index.html], последовательности микроРНК – из БД миРНК [https://www.mirbase.org]. Структуры Bst exo- были взяты из БД PDB [https://www.rcsb.org/]. Подбор нуклеотидных последовательностей, дизайн праймеров, конструирование НК-матриц и праймеров с искусственными последовательностями осуществляли с помощью перечисленных в п.2.2. программных средств. Анализ нуклеотидных последовательностей проводили в BioEdit [https://bioedit.software.informer.com/], Mega4 [https://www.megasoftware.net/], Geneious 7.1.3 [https://www.geneious.com/download/previous-versions/]. Для молекулярного моделирования и докинга использовали пакет программ Schrodinger Suite 2016-4 [https://www.schrodinger.com/]. обработки И анализа электрофоретических Для изображений применяли TotalLab 1.10 [https://totallab.com/].

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Одним из наиболее сложных объектов для амплификационно-опосредованного анализа являются короткоцепочечные НК (кцНК), к которым относятся разрушенные (фрагментированные) ДНК/РНК и малые РНК. В препаратах разрушенных НК содержатся молекулы разной длины, и только часть из них пригодны для амплификации (т.е. способны служить матрицами для ДНК-синтеза). В данном случае сталкиваются с ситуацией, когда при кажущейся достаточности НК-материала, рассчитанной на основании измеренного количества, реальное содержание амплифицируемых мишеней в образце существенно ниже. Неверное представление о количестве и состоянии НКмишени может обусловить выбор неподходящего протокола исследования и привести к получению недостоверного результата. Кроме того, в силу невозможности точного НК-цепей определения точек расщепления подбор оптимальной нуклеотидной соответственно, праймеров амплификации последовательности мишени И, для разрушенных НК затруднен. В случае малых РНК размер и последовательность мишеней четко детерминированы, однако затруднения при проведении амплификации обусловлены сложностью конструирования подходящей праймерной системы.

При амплификации кцНК оправдано применение системы сближенных праймеров. С подобной системой приходится иметь дело также при использовании некоторых методов амплификации, например, АКК в варианте рамификации или мультипраймерной АКК в силу особенностей строения соответствующей матрицы. Основной проблемой в данном случае является сложность дискриминации специфических и побочных ампликонов, в частности, продуктов димеризации. Кроме того, при амплификации коротких НК-мишеней образование побочных продуктов облегчено, поскольку кцНК обладают праймероподобными свойствами И обеспечивают более высокую эффективность фальш-праймирования. В целом, накопление коротких ампликонов в силу кинетических особенностей реакций амплификации является более предпочтительным.

3.1. ФРАГМЕНТАЦИЯ ДНК УЛЬТРАЗВУКОМ

Молекулы НК, как и молекулы прочих полимеров, способны разрушаться (разрываться) под действием механических сил. Фрагментация НК происходит при любых манипуляциях: при их выделении из биологических образцов (дробление/измельчение биоматериала, сорбция/десорбция на носителях), при интенсивном перемешивании, фильтрации, замораживании и последующем оттаивании водных растворов. Очевидно,

что степень разрушения полинуклеотидных цепей зависит от интенсивности воздействия. Целенаправленное механическое разрушение ДНК проводят путем облучения ее водных растворов ультразвуком (УЗ), что находит применение, например, при подготовке ДНКбиблиотек для NGS-секвенирования. НК могут подвергаться опосредованному УЗвоздействию, например, в тех случаях, когда необходимо их извлечение из твердого мелкодисперсного биологического образца. Однако остается открытым вопрос о степени пригодности ДНК-препаратов, подвергшихся механической фрагментации, для амплификационно-опосредованного анализа и о достоверности получаемых при этом результатов, особенно при определении копийности мишени. Оценка влияния нуклеотидного контекста на характер фрагментации ДНК необходима для выработки рекомендаций по подбору оптимальных НК-мишеней и праймеров.

Фрагментация ДНК под действием УЗ является, на наш взгляд, наиболее удобным способом искусственного разрушения полинуклеотидных цепей. Она не требует использования каких-либо реагентов и позволяет получать "чистые" препараты для дальнейшей работы. Нами изучен характер УЗ-фрагментации ДНК в зависимости от первичной структуры, размера молекул и статуса метилирования цитозина. При планировании экспериментов этой части работы отталкивались от следующих данных: 1) УЗ вызывает одно- и двунитевые разрывы цепей ДНК, при этом размер образующихся фрагментов зависит от интенсивности и продолжительности его воздействия [Elsner, Lindblad, 1989; Larguinho et al., 2010], 2) разрывы в ДНК под действием УЗ чаще всего происходят в местах, содержащих динуклеотиды 5'-CG-3' [Гроховский, 2006].

УЗ-фрагментации подвергали тотальную ДНК нескольких организмов и ДНКампликоны разной длины и нуклеотидного состава (с различным содержанием динуклеотидов 5'-CG-3'). Фрагментацию осуществляли в приборе BioRuptor (Diagenode), предназначенном для приготовления ДНК-библиотек для секвенирования методами NGS. Разрушение ДНК в нем осуществляется непосредственно в пробирках типа eppendorf при трех возможных режимах воздействия: слабого ("low", мощность 160 Вт, частота 20 кГц), среднего ("medium", 200 Вт, 40 кГц) и сильного ("high", 320 Вт, 60 КГц). Степень фрагментации оценивали с помощью гель-электрофореза с последующей денситометрией полос исходной ДНК и шмера, состоящего из продуктов фрагментации, а также с помощью количественной ПЦР (кПЦР).

Сначала осуществляли подбор оптимальных условий фрагментации с использованием ДНК фага Лямбда (далее λ), геном которого характеризуется небольшим размером (48502 п.о.). УЗ-обработка ДНК λ в режиме "high" в 50 мкл раствора показала закономерное повышение степени фрагментации с увеличением продолжительности

воздействия. При двухминутном облучении ДНК практически не разрушалась, а с увеличением продолжительности воздействия диапазон фрагментов ДНК в геле сужался, достигнув максимума плотности в области 300 п.о. при 10-минутном и в области 200 п.о. при 38-минутном воздействии (рис. 3.1), что согласуется с литературными данными [Elsner, Lindblad, 1989]. Для режимов "low" и "medium" также наблюдалось разрушение, но оно происходило с меньшей скоростью, а на электрофореграмме наблюдали более протяженный шмер с менее выраженным максимумом (данные не приведены). Подобранные условия фрагментации использовали далее на различных этапах работы с препаратами тотальной ДНК.



Рис. 3.1. Фрагментация ДНК фага Лямбда ультразвуком (режим "high", объем раствора 50 мкл). Дорожки: 1 – 2 мин воздействия, 2 – 10 мин, 3 – 26 мин, 4 – 38 мин (М – маркер 100 п.о.).

Гель-электрофорез недостаточно информативен при оценке влияния условий среды и нуклеотидной последовательности на фрагментацию, поэтому для подобной оценки были взяты ДНК-ампликоны. Их размер и нуклеотидный состав четко детерминированы, что дает определенные преимущества при интерпретации получаемых результатов. Использование ДНК-ампликонов с дальнейшей экстраполяцией данных на естественное поведение молекул протяженных дцДНК, на наш взгляд, является возможным в силу того, что при механическом воздействии их поведение схоже и определяется конформационнодинамическими свойствами полимерных молекул.

Сначала подобрали видоспецифичные праймеры к фрагменту нуклеотидной последовательности гена 28S *pPHK* богомола обыкновенного *Mantis religiosa* (глава 2, табл. 2.2, олигонуклеотиды №№1-7), представленному на рисунке 3.2. Обратные праймеры R166, R'349, R621 и R1029 дают с прямым праймером F1 продукты длиной 166 (ампликон A166), 349 (A349), 621 (A621) и 1029 (A1029) п.о., соответственно. Обратный

праймер R'352 с прямым праймером F2 образует продукт длиной 352 п.о. (А352). Ампликоны были наработаны в препаративных количествах, очищены от компонентов реакционной смеси и подвергнуты действию УЗ. Сначала подбирали рабочие параметры УЗ-обработки ДНК-ампликонов. В качестве реперного брали ампликон средней длины – А621. Для определения достаточного для разрушения объема водного раствора ДНК обработку проводили в 5, 15, 25 и 50 мкл в течение 10, 20 и 30 мин. Полному разрушению ДНК подвергалась только в растворах объемом 25 и 50 мкл после 20-минутной обработки (данные не приведены). При меньшем объеме расщепление ДНК не протекало, что было связано с диспергированием жидкости на мелкие капли и, вероятно, с низкой эффективностью образования в них кавитационных пузырьков. Упомянутые выше условия фрагментации были найдены для режима "high"; в режимах "low" и "medium" ампликон А621 не разрушался. В связи с этим УЗ- обработку ДНК-ампликонов проводили только в режиме "high" при продолжительности до 45 мин, использовали 25 мкл раствора ДНК.



Рис. 3.2. Нуклеотидная последовательность фрагмента гена 28S *pPHK M.religiosa*, использованная для получения ДНК-ампликонов (указано расположение праймеров).

3.1.1. Влияние длины молекул на фрагментацию ДНК

Очевидно, что с увеличением длины молекул ДНК скорость УЗ-фрагментации должна возрастать. Ампликоны конструировали с учетом персистентной длины ДНК, составляющей около 50 нм: размер А166 соответствует примерно одной, А349 и А352 –

двум, A621 – четырем, а A1029 – семи персистентным длинам ДНК. Данные ампликоны характеризуются высоким содержанием динуклеотидов 5'-CG-3'. Поскольку разрывы цепей ДНК чаще происходят по 5'-CG-3'-сайтам, предположили, что ампликоны будут расщепляться достаточно эффективно. Их УЗ-обработка привела к образованию ДНК, проявляющейся в гелях в виде характерного шмера (рис. 3.3). В дорожках геля, соответствующих каждому образцу, выделяли по две области: четко выраженная полоса, соответствующая размеру исходного ампликона, и область шмера ниже этой полосы. Денситометрия зон позволила найти соотношение неразрушенных и фрагментированных ДНК для каждого образца.



Рис. 3.3. Фрагментация ампликонов A166, A352, A621 и A1029 в водных растворах (M1 – маркер pUC19/MspI, M2 – маркер 100 п.о.).

За 100%-ное количество принимали суммарную плотность обеих зон. Ампликон A166 не подвергался фрагментации даже спустя 30 мин облучения, для A352, A621 и A1029 заметное разрушение наблюдалось после 20-минутной обработки. Эффективность фрагментации увеличивалась с ростом размера молекул. Для A352 наблюдалась частичная фрагментация: даже после 30 мин облучения сохранялись целые молекулы. Для A621 и A1029 через 0,5 ч воздействия наблюдалось полное разрушение. Показательно, что во всех случаях минимальный размер образующихся фрагментов (нижняя граница шмера) составлял более 100 п.о.

Таким образом, молекулы ДНК размером не более одной персистентной длины в чистой воде (В-форма) не подвергаются УЗ-фрагментации. Однако на конформацию двойной спирали существенное влияние могут оказывать компоненты раствора. В связи с этим изучали поведение ампликонов при их облучении УЗ в растворах 2 М хлорида натрия, 50%-ного этанола и 30%-ного формамида (рис. 3.4). Ампликон А166 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 ампликонов А352, А621 и А1029 существенно ускорялось в присутствии NaCl.



Рис. 3.4. 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.

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.
3.1.2. Оценка сиквенс-специфичности фрагментации ДНК

Ранее было показано, что легче всего под действием УЗ разрушаются фосфодиэфирные связи между дезоксицитидином и соседним нуклеотидом в сайтах CpN, а относительная интенсивность расщепления R уменьшается в следующем порядке: d(CpG)>d(CpA)≥d(CpT)>d(CpC). Для CpN сайтов средние значения R превышают 1,0 (1,45 для CpG, 1,16 для CpA, 1,13 для CpT и 1,01 для CpC, соответственно), тогда как для всех других динуклеотидов величина R не превышает 1,0 [Grokhovsky et al., 2011]. Хотя динуклеотиды 5'-CG-3' влияют на эффективность УЗ-фрагментации ДНК, для относительно коротких молекул это влияние, на наш взгляд, не совсем очевидно, поэтому далее изучали разрушение НК на примере тотальной ДНК с помощью кПЦР. Мы предположили, что количество амплифицируемых ДНК-мишеней в препаратах фрагментированной ДНК будет снижаться в зависимости от длительности УЗ-обработки, длины амплифицируемых участков и содержания динуклеотидов 5'-CG-3' в них.

В качестве модельных объектов были взяты ДНК *M.religiosa* и пчелы медоносной *A.mellifera*. В первом случае амплифицировали ту же последовательность части гена 28S *pPHK* и использовали те же праймеры, что и при наработке ДНК-ампликонов. Дополнительно были использованы еще три пары: F3/R1029, MR br aF1/MR br aR1 и MR br aF2/MR br aR2, представляющие собой вариант максимального сближения праймеров и дающие ампликоны длиной 47 (A47), 50 (A50) и 44 (A44) п.о., соответственно (табл. 2.2, №№8-12). ДНК *M.religiosa* облучали УЗ в течение 15 мин в режиме "medium". На электрофореграмме фрагментированной таким образом ДНК наблюдался шмер от 100 до 2500 п.о., характеризовавшийся отсутствием четко выраженного максимума (рис. 3.5).



Рис. 3.5. Фракционирование фрагментированной ДНК *М. religiosa* (15 мин воздействия УЗ, 50 мкл раствора, режим "medium", М – маркер 100 п.о.).

На основе данного образца для последующих экспериментов готовили 4 ДНКпрепарата, полученных элюцией из соответствующих зон агарозного геля фрагментов разной длины со следующими примерными размерами: 50-200 (зона I), 500-700 (зона II), 900-1100 (зона III) и 1400-2000 п.о. (зона IV). Выбранный участок гена 28S *pPHK* содержит 105 динуклеотидов 5'-CG-3', расположенных по последовательности неравномерно: наибольшее их количество приходится на ее вторую половину, что теоретически должно обеспечивать большее количество точек разрыва в ней и сказаться тем самым на эффективности ПЦР с разными парами праймеров. Для подтверждения этого предположения была проведена ПЦР-амплификация исходной цельной ДНК и ДНКфракций с детекцией по конечной точке; количество ДНК в ПЦР-образцах было одинаковым (30 нг, или 10⁴ копий генома). Образование целевых продуктов ПЦР к 30 циклу для всех фракций наблюдалось только для пары праймеров F1/R166, дающей наиболее короткий ампликон (табл. 3.1).

Таблица	3.1.	Влияние	удаленности	праймеров	И	размера	мишени	на	протекание	ПЦР-
амплифин	кации	1 УЗ-разру	ушенной ДНК	M.religiosa	(c	тандартн	ные услов	ия I	ПЦР).	

Праймерные	Зона геля	Количество ПЦР-циклов						
пары	50114 1 0.17	30	35	40				
	Ι	+	+	+				
	II	+	+	+				
F1/R166	III	+	+	+				
	IV	+	+	+				
	I-IV	+	+	+				
	Ι	-	-	-				
	II	-	+	+				
F1/R621	III	-	+	+				
	IV	-	+	+				
	I-IV	-	+	+				
	Ι	-	-	-				
	II	-	-	-				
F1/R1029	III	-	-	-				
	IV	-	+	+				
	I-IV	-	+	+				

С увеличением расстояния между праймерами (для пар F1/R621 и F1/R1029) эффективность наработки соответствующих ампликонов закономерно снижалась; их образование наблюдалось только при количестве циклов более 35. Интересным

представляется результат, полученный для праймеров F1 и R1029 и ДНК, выделенной из зоны III. Несмотря на наличие в ДНК из данной зоны фрагментов с размером, достаточным для амплификации, ПЦР не приводила к наработке целевого ампликона даже к 40 циклу реакции. Только при использовании более длинных ДНК-матриц (зона IV) наблюдалось успешное протекание ПЦР. Очевидно, такой результат объясняется практически полным отсутствием цельной мишени в препарате ДНК из зоны III. Таким образом, справедливой является рекомендация об использовании при амплификации фрагментированной ДНК праймеров, расположенных на более близком расстоянии друг к другу (100-150 нт).

Далее проводили ПЦР в реальном времени и оценивали количество мишеней, доступных для амплификации (величина N_{DNA}), с парами праймеров, дающих ампликоны A166, A349, A352, A47, A44 и A50 (рис. 3.6). Найденные значения N_{DNA} оказались меньше рассчитанных по концентрации ДНК как минимум на порядок (табл. 3.2). Максимальное значение N_{DNA} найдено для A166, даже несмотря на бо́льшую плотность динуклеотидов 5'-CG-3' в нем по сравнению с A349, что подтверждает предпочтительность амплификации более коротких участков ДНК. При анализе амплификации A349 и A352 обнаружено существенное снижение N_{DNA}, которое удовлетворительно коррелировало с увеличением числа динуклеотидов 5'-CG-3'. Такая корреляция справедлива для фрагментов размером более 100 п.о.; для сближенных праймеров наблюдалось аномальное снижение N_{DNA} вне зависимости от количества 5'-CG-3' (продукты A47, A50 и A44). Данный результат объясняется, вероятно, снижением эффективности ПЦР за счет конкурентного отжига в системах "матрица-матрица" и "матрица-праймер".



Рис. 3.6. Количественная ПЦР-амплификация фрагментированной ДНК *M.religiosa* (на примере пары F1/R166, стандартные условия амплификации). Кривые амплификации: 1 – количество копий генома 10⁵, 2 – количество копий генома 10⁴, 3 – количество копий генома 10³.

Ампликон	Длина,	Количество	Кол-во копий	Кол-во копий генома
	п.о.	5'-CG-3'	генома до	после фрагментации,
			фрагментации	Nднк
A166	166	17		992 ± 20
A349	349	26		558 ± 23
A352	352	42	10^{4}	378 ± 69
A47	47	2		114 ± 8
A50	50	0		67 ± 5
A44	44	1		48 ± 2

Таблица 3.2. Количество мишеней во фрагментированной ДНК *M.religiosa*, доступных для амплификации.

Таким образом, на нуклеотидной последовательности длиной около 1000 п.о. показано различие в протекании амплификации целевых участков ДНК в зависимости от их длины и количества 5'-CG-3'. Однако последовательность 28S pPHK характеризуется высокой плотностью 5'-CG-3', и их близкое расположение может влиять на разрушение ДНК за счет эффекта "нещепления концов". Для дальнейших экспериментов была взята ДНК пчелы медоносной. Ее геном полностью секвенирован и содержит протяженные (до нескольких т.п.о.) области без 5'-CG-3', а также области со средней и высокой плотностью 5'-CG-3'. В качестве мишеней для амплификации брали уникальные нуклеотидные последовательности из некодирующих областей генома для исключения влияния метилирования на фрагментацию. Известно, что уровень метилирования нерегуляторных сайтов в геноме пчелы не превышает 20%, а метилированы в основном экзоны [Lyko et al., 2010]. В исследование были взяты восемнадцать участков, разделенных на четыре группы в зависимости от персистентной длины ДНК: I – участки короче 100 п.о. (менее одной персистентной длины), II – участки длиной около 150 п.о. (одна персистентная длина), III – участки длиной около 300 п.о. (две персистентные длины) и IV – участки длиной около 450 п.о. (три персистентных длины). Каждая группа была представлена участками с различным количеством 5'-CG-3' и других динуклеотидов 5'-СМ-3' (табл. 3.3).

Опытный образец ДНК пчелы медоносной был получен смешиванием 100 образцов ДНК, выделенных из грудных мышц рабочих пчел. Биоматериал брали зимой, когда пчелы не активны. ДНК пчелы с концентрацией 3 нг/мкл (10⁴ копий ДНКмишени/мкл) подвергали серийной УЗ-обработке: краткая (2 мин), средняя (8 мин) и продолжительная (38 мин). ПЦР-эксперименты с использованием соответствующих праймеров (табл. 2.2, №№13-44) показали снижение количества амплифицируемых мишеней для всех областей по сравнению с теоретическим уровнем (рис. 3.7). Значимые данные были получены только для ДНК после продолжительной обработки (табл. 3.3). Выявлено постепенное снижение N_{DNA} с увеличением размера амплифицируемой области, что связано с уменьшением количества целых молекул в препаратах фДНК. Любопытно, что для всех амплифицированных областей значения N_{DNA} незначительно превышали теоретически ожидаемое количество (то есть 10⁴ копий) для образцов ДНК после кратковременной УЗ-обработки (табл. 3.3), что можно объяснить увеличением эффективности ПЦР за счет более эффективной денатурации укороченных молекул ДНК.



Рис. 3.7. Количество доступных для амплификации ДНК-мишеней по данным ПЦРамплификации различных участков генома *A.mellifera* (для образцов ДНК после 38 мин облучения ультразвуком, стандартные условия ПЦР). Пунктирной линией отмечен уровень теоретического (ожидаемого) количества ДНК-мишеней.

Несмотря на различие в количестве динуклеотидов 5'-CG-3' в амплифицируемых участках в пределах каждой группы (например, от 0 до 55 для группы IV), N_{DNA} различается незначительно, что связано, скорее всего, с присутствием еще и динуклеотидов 5'-CA-3' и 5'-CT-3', которые также имеют относительно высокие значения R (1,16 и 1,13 соответственно). Тем не менее, 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 (эффект "нещепления концов"). Максимальное снижение N_{DNA} (Δ lgN_{DNA} ~2-2,4), наблюдалось для двух областей: без 5'-CG-3' (IV-max) и с высокой плотностью 5'-CG-3' (IV-40), что связано со снижением сиквенс-специфичности фрагментации для относительно протяженного участка амплификации.

		Размер, п.о.	Количество линуклеотилов*				Разпеченность**			lgN_{DNA}			
Груп-	Название		K0J.	ичество дин	уклеотидо	JR .	I d	зреженность	. .	Продолжит	ельность УЗ-об	бработки, мин	
па	амплико- на		5'-CG- 3'	5'-CA-3' + 5'-CT-3'	5'-CC- 3'	5'- CN-3'	5'-CG- 3'	5'-CA-3' + 5'-CT- 3'	5'-CN- 3'	2	8	38	
	I-max	95	0	0	0	0	-	-	-	4,02±0,12	3,88±0,06	3,69±0,12	
т	I-20	60	3	1	2	6	20	60	10	4,06±0,09	3,95±0,10	3,59±0,15	
1	I-14	72	5	2	2	9	14	36	8	$4,08\pm0,10$	3,80±0,10	3,42±0,09***	
	I-7	65	9	0	1	10	7	-	7	4,09±0,08	3,88±0,11	3,51±0,07	
Π	II-max	150	0	10	1	11	-	15	14	4,00±0,07	4,06±0,08	3,45±0,08	
	II-19	154	8	18	1	27	19	9	6	$4,07{\pm}0,06$	3,99±0,08	3,26±0,04	
	II-13	154	12	6	0	18	13	26	9	4,17±0,05	3,79±0,12	3,10±0,06	
	II-9	157	17	3	2	22	9	52	7	4,06±0,12	4,03±0,14	3,58±0,07	
	III-max	282	0	21	1	22	-	13	13	4,16±0,03	3,90±0,10	3,14±0,10	
	III-23	300	13	37	3	53	23	8	6	$4,08{\pm}0,05$	3,91±0,07	3,31±0,04	
III	III-16	320	20	30	2	52	16	11	6	4,18±0,12	3,83±0,08	2,65±0,07	
	III-12	300	26	24	11	61	12	13	5	4,12±0,09	3,96±0,05	2,74±0,11	
	III-8	304	36	43	3	82	8	7	4	4,16±0,11	3,92±0,05	3,02±0,06	
	IV-max	448	0	47	1	48	-	10	9	4,18±0,08	3,66±0,05	1,97±0,03	
	IV-40	401	10	34	3	47	40	12	9	4,11±0,06	3,59±0,09	2,41±0,09	
IV	IV-32	442	14	32	0	46	32	14	10	4,17±0,07	3,74±0,08	3,08±0,07	
	IV-14	454	32	29	3	64	14	16	7	4,21±0,09	3,24±0,18	$2,50\pm0,04$	
	IV-8	441	55	31	2	88	8	14	5	4,15±0,07	3,99±0,13	2,92±0,09	

Таблица 3.3. Участки амплификации ДНК из *A. mellifera* и значения lgN_{DNA}, найденные после ПЦР-амплификации разрушенной ДНК (10⁴ копий ДНКмишени на образец, стандартные условия ПЦР).

* указано количество динуклеотидов в межпраймерном участке.

** разреженность определяется как отношение размера ампликона к количеству динуклеотидов в нем.

*** жирным шрифтом и серой заливкой выделены минимальные в группах значения lgN_{DNA}.

Таким образом, расположение 5'-CG-3' определяет характер УЗ-расщепления ДНК, но это наблюдение справедливо только для участков размером более одной персистентной длины, поскольку для группы I эта зависимость не была обнаружена. Следовательно, содержание 5'-CN-3' должно учитываться при выборе диагностической 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 количественной ПЦР-амплификации ДНК, разрушенной УЗ.

3.1.3. Влияние метилирования СрG на фрагментацию ДНК

Поскольку ДНК разрушается при обработке УЗ преимущественно по СрG-сайтам, а метилирование цитозина вызывает локальное увеличение жесткости цепи, ΜЫ предположили, что метилированная ДНК (метДНК) фрагментируется быстрее, чем неметилированная (неметДНК). Для оценки влияния метилирования цитозина на фрагментацию использовали ДНК λ (dam-/dcm-). Геном λ является GC-богатым и содержит аномально большое количество динуклеотидов CpG: 3113 CpG на весь геном (48502 п.о.). В геноме λ динуклеотиды CpN распределены относительно равномерно, но первая половина содержит больше CpG, чем вторая. Область от 22000 до 27000 п.о. характеризуется наименьшим содержанием CpG, но наиболее протяженная последовательность без CpG имеет длину всего 257 п.о. и совсем невозможно найти какую-либо длинную последовательность без динуклеотидов CpN. Из-за относительно однородного расположения СрG их вклад в УЗ-расщепление ДНК практически одинаков по всему геному, поэтому удобно оценивать влияние метилирования CpG с использованием именно этого объекта.

ДНК λ метилировали *in vitro* с помощью СрG метилтрансферазы (M.SssI) в соответствии с разработанным нами протоколом, который обеспечивает полное метилирование СрG. Эффективность реакции составила ~100%, что подтверждали расщеплением ДНК чувствительной к метилированию рестрикционной эндонуклеазой НраII (фаг λ содержит 328 сайтов рестрикции НраII) (Приложение, рис. П1). Был также подготовлен образец неметилированной ДНК λ , идентичный по составу метилированной ДНК, но содержащий инактивированный фермент M.SssI. Предварительно провели оценку результатов УЗ-фрагментации ДНК λ с помощью гель-электрофореза, которая показала, что метилированная ДНК разрушается быстрее, чем неметилированная (рис. 3.8А). Максимальная разница в размерах фрагментов наблюдалась после умеренного по

продолжительности УЗ-воздействия (16 мин); длительная обработка приводила к фрагментам равной длины.

Поскольку электрофорез не выявляет сиквенс-специфичность фрагментации, определяли значения N_{DNA} для обоих типов ДНК λ с соответствующими праймерами (табл. 2.3, №45-60). Были проанализированы девять областей (L1-L9, Приложение, табл. П1) разной длины с различающимся количеством CpN (табл. 3.4). Максимальное снижение величины N_{DNA} наблюдалось для протяженных участков (например, lgN_{DNA} ~1,5 для L7 в образце метДНК). С увеличением продолжительности УЗ-обработки количество неразрушенных молекул снижалось. Для большинства амплифицируемых участков максимальное различие между N_{DNA} для неметДНК и метДНК было получено при минимальной по продолжительности УЗ-обработке (2 и 8 мин), несмотря на то, что в течение этого периода времени ни метДНК, ни неметДНК не разрушались до коротких фрагментов, как следует из данных гель-электрофоретического анализа. Вероятно, это объясняется тем, что после начала облучения в ДНК образуются однонитевые разрывы (ники) [Il'icheva et al., 2009], которые визуально (в геле) не проявляются, но влияют на протекание ПЦР. Для всех областей после кратковременной УЗ-обработки значение NDNA несколько увеличивалось для неметДНК по сравнению с количеством исходной ДНК, в то время как для метДНК оно сразу снижалось (рис. 3.8Б). Таким образом, УЗ-расщепление ДНК по метилированному СрG-сайту является более предпочтительным.



Рис. 3.8. Ультразвуковая фрагментация ДНК λ: (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 10⁵ копий мишени, стандартные условия ПЦР).

		Количество динуклеотидов*					Разреженность**			lgN _{DNA}				
Название	Размер,	5'-CG- 3'	5'-CA-3'	5'-	5'-	5'-	5'-CA-	5'-	5'- образца	Продолжительность УЗ-обработки, мин				
ампликона	11.0.		$+5^{2}-CT-3^{2}$	CC-3'	3'	CG- 3'	$3^{7} + 5^{7} - $ CT-3'	CN- 3'	ДНК	2	8	16	38	
T 1	167	0	10	0	10		17	17	немет	5,19±0,15	5,07±0,08	4,96±0,07	4,74±0,08	
LI	107	0	10	0	10	-	17	1/	мет	4,50±0,21	4,52±0,12	4,49±0,16	4,41±0,10	
	120	7	10	1	10	20	14	0	немет	5,34±0,10	5,21±0,08	5,07±0,12	4,95±0,06	
L2	139	/	10	1	10	20	14	0	мет	4,75±0,08	4,69±0,07	4,61±0,09	4,55±0,11	
т 2	154	14	0	0	22	11	10	7	немет	5,28±0,13	5,09±0,11	4,93±0,08	4,81±0,10	
L3	154	14	8	0	22	11	19		мет	4,77±0,09	4,61±0,20	4,57±0,15	4,42±0,07	
I. 4	245 2 22	1	26	26 172	10	10	немет	5,17±0,10	4,97±0,07	4,83±0,09	4,58±0,05			
L4	545	Δ	33	1	50	175	10	10	мет	4,72±0,08	4,69±0,09	4,60±0,10	4,50±0,12	
15	256	12	20	1	41	20	12	0	немет	5,21±0,08	5,14±0,10	4,92±0,05	4,67±0,07	
LJ	550	12	28	1	41	50	15	9	мет	4,62±0,05	4,66±0,15	4,61±0,06	4,50±0,08	
LC	240	26	26	5	77	10	10	4	немет	5,19±0,06	4,91±0,10	4,68±0,07	3,97±0,06	
LO	542	30	30	5	//	10	10	4	мет	4,60±0,08	4,53±0,18	4,22±0,05	3,70±0,09	
17	400	22	57	1	80	22	0	6	немет	5,12±0,13	5,02±0,10	4,83±0,11	3,67±0,08	
L7	499	22	57	1	80	23	9	0	мет	4,71±0,08	4,64±0,09	4,28±0,06	3,49±0,11	
τo	490	22	17	2	70	21	10	7	немет	5,08±0,11	5,17±0,08	4,91±0,03	4,14±0,07	
Lð	480	25	47	Z	12	21	10	10 /	мет	4,77±0,08	4,69±0,09	4,30±0,05	3,87±0,07	
10	461	461 39	39 37	2	70	10	12	7	немет	5,10±0,09	5,06±0,06	4,97±0,08	4,28±0,09	
L9	461			3		12	12	/	мет	4,85±0,10	4,72±0,07	4,51±0,08	4,11±0,06	

Таблица 3.4. Участки амплификации в геноме λ и значения lgN_{DNA}, полученные по результатам ПЦР-амплификации препаратов разрушенной ДНК λ (10⁵ копий мишени на реакцию, стандартные условия ПЦР).

* указано количество динуклеотидов в межпраймерном участке.

** разреженность определяется как отношение размера ампликона к количеству динуклеотидов в нем.

3.2. ПЦР-АМПЛИФИКАЦИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СБЛИЖЕННЫХ ПРАЙМЕРОВ

Необходимость изучения разрушенной ДНК обусловливает поиск новых способов ее амплификации, но достойной альтернативы ПЦР до сих пор нет. Классическая ПЦР часто неприменима для анализа фДНК, поэтому были предложены варианты ПЦР со сближенными праймерами и детекции коротких ампликонов. Однако крайне мало работ, посвященных детальному изучению молекулярных основ такого варианта ПЦР.

3.2.1. Особенности протекания ПЦР со сближенными праймерами

Для изучения особенностей протекания ПЦР с использованием сближенных праймеров подобрали видоспецифичные праймеры к уникальным нуклеотидным последовательностям ДНК пчелы медоносной (A. mellifera), богомола обыкновенного (M. religiosa), человека (H.sapiens), ели сибирской (P.obovata), сосны обыкновенной (P.sylvestris), лиственницы сибирской (L.sibirica), дуба обыкновенного (Q.robur), липы сердцевидной (T.cordata). Нуклеотидные последовательности соответствующих мишеней были взяты из базы данных NCBI. Праймеры подбирали самостоятельно (т.е. без автоматизированных специализированных программных средств), ИХ качество, "реакционную" специфичность и термодинамические характеристики оценивали с помощью онлайн-утилиты Oligoanalyzer, а видоспецифичность – с помощью BLAST. Были подобраны по две пары праймеров к ДНК каждого вида: "классические" прямой (F) и обратный (R) для "традиционной" ПЦР, и прямой (aF) и обратный (aR) праймеры, расположенные встык друг к другу (табл. 2.4, №№91-128). Для пар aF/aR 3'-концы праймеров отжигаются на смежных нуклеотидах комплементарных цепей матрицы, а размер ампликонов определяется суммой длин праймеров. К ДНК пчелы и человека было подобрано еще по три обратных праймера (nR1, nR2 и nR3), располагающихся на некотором расстоянии от парного им прямого праймера. 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. 3.9).

Предварительная проверка показала высокую видоспецифичность всех праймеров, которую определяли, комбинируя в ПЦР ДНК вышеуказанных организмов и праймеры. На рисунке 3.10А в качестве примера представлены результаты ПЦР для сочетаний праймеров "встык" и ДНК пчелы, ели и человека.



Рис. 3.9. Места отжига "классических" (F/R), сближенных (aF/nR1/nR2/nR3) праймеров и праймеров "встык" (aF/aR).



Рис. 3.10. Оценка мишень-специфичности праймеров (стандартные условия ПЦР). (А) Результаты амплификации ДНК пчелы медоносной, ели и человека (30 циклов ПЦР): 1-3 – праймеры AM aF/AM aR (пчела); 4-6 – PO aF/PO aR (ель); 7-9 – HS aF/HS aR (человек); 1, 4, 7 – ДНК пчелы; 2, 5, 8 – ДНК ели; 3, 6, 9 – ДНК человека; К – отрицательный контроль. (Б) Специфичность ПЦР-амплификации ДНК богомола обыкновенного с "классическими" праймерами и праймерами "встык" (10³ копий мишени, 40 циклов ПЦР): 1 – праймеры MR aF/MR aR, 2 – MR F/MR R, M – маркер pUC19/MspI.

Специфичные продукты амплификации были получены с использованием всех пар праймеров. Для пар F/R после длительной амплификации (более 40 циклов) часто наблюдали, помимо целевых ампликонов, образование и неспецифических продуктов, тогда как для праймеров "встык" всегда образовывались исключительно специфичные ампликоны (на рис. 3.10Б в качестве примера приведен результат для ДНК *M. religiosa*). Ни в одном из этих случаев для праймеров "встык" не происходило образования димеров, что подтверждали секвенированием ампликонов. Однако для праймеров "встык", подобранных к ДНК человека, специфические ампликоны обнаруживались во всех образцах вне зависимости от видовой принадлежности взятой ДНК, а также в ОК, что объясняется наличием ДНК человека в реактивах (рис. 3.10А, дорожки 7-9 и К, обсуждено далее в разделе 3.2.2).

Сближенное расположение праймеров определяет ряд преимуществ, влияющих на специфичность и чувствительность амплификации. Так, малый размер образующихся ампликонов не должен требовать высокой температуры и длительности этапа денатурации, поскольку расхождение цепей коротких дцДНК с GC-составом около 40-60% может протекать достаточно быстро уже при 75-85°C. Также отсутствует

необходимость продолжительной элонгации, т.к. большинство коммерческих термостабильных ДНК-полимераз успевают синтезировать цепь длиной до 100 нт за несколько секунд [Perler et al., 1996]. Для подтверждения указанных заключений 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 амплификации (30 циклов) и 10⁴ копий мишени, в качестве которой выбрали уникальную нуклеотидную последовательность из некодирующей области генома (XM_006557349.1). Оптимизацию начали с уменьшения продолжительности этапа денатурации с 10 до 5 и затем до 1 секунды; об эффективности судили по наличию или отсутствию полос продуктов на электрофореграммах. Оказалось, что при стандартной прдолжительности прочих этапов для образования детектируемого количества коротких ампликонов достаточно денатурации в течение 1 с (минимально возможная для установки на использованном ДНК-амплификаторе продолжительность этапа). Аналогичный результат получен для этапа элонгации. Проведение этого этапа в течение 1 с (при денатурации в течение 1 с) привело к образованию детектируемого количества продуктов амплификации. В то же время, оптимальная продолжительность этапа отжига праймеров оказалось равной 5 с. При меньшей (1 с) продолжительности эффективность наработки ампликонов снижалась, а увеличение до 10 с и более не приводило к повышению эффективности ПЦР. Подобный результат объясняется, вероятно, тем, что для эффективного отжига требуется определенное время для диффузии и гибридизации праймеров на матрице. Таким образом, для успешной ПЦР-амплификации с праймерами "встык" достаточно сокращенной программы, состоящей из циклов продолжительностью 1-5-1 с для этапов денатурации, отжига и элонгации, соответственно (рис. 3.11).

Обычная:		Сокращенная:
1. 95 °С – 3 мин		1. 95 °С – 3 мин
2. 95 °C – <mark>15 -30 c</mark>	(денатурация)	2. 95 °C – <mark>1 c</mark>
45-65 °С – <mark>20-60 с</mark>	(отжиг)	45-65 °С – <mark>5</mark> с
72 °C <mark>– 20-40 c</mark>	(элонгация)	72 °C – <mark>1 c</mark>
3. 72 °С – 20-40 с		3. 72 °C − 20-40 с
4. 10 °C - ∞		4. 10 °C - ∞

Рис. 3.11. Оптимизация временно́го режима ПЦР со сближенными праймерами (показано на примере ДНК *A.mellifera* и праймеров к ней).

Далее был оптимизирован температурный режим и оценена возможность сокращения общей продолжительности амплификации за счет изменения температуры этапов денатурации и отжига. С помощью градиентного режима работы ДНК-

амплификатора были найдены пороговые значения температуры, при которых имело место эффективное протекание ПЦР. В данном случае амплифицировали ту же мишень, что и при оптимизации временно́го режима, но в реакционные смеси добавляли сразу все праймеры: AM F, AM R, AM aF, AM aR, AM nR1, AM nR2, AM nR3. Пороговые температуры определяли по отсутствию соответствующих продуктов амплификации в геле (рис. 3.12A). Задавали те же параметры, что и в предыдущих экспериментах: 10⁴ копий мишени (уникальная нуклеотидная последовательность в геноме *A.mellifera*), 30 циклов амплификации. При использовании сокращенной программы (1-5-1 с) температурный предел этапа денатурации в случае классических праймеров составил около 90°C, в то время как для праймеров "встык" – около 80°C (рис. 3.12Б).



Рис. 3.12. Оптимизация температурного режима ПЦР со сближенными праймерами (ДНК *A. mellifera*, 10⁴ 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 сближенных праймеров (aF-nR) пороговые температуры денатурации оказались в диапазоне 80-90°С, повышающиеся с увеличением расстояния между праймерами. Пороговые значения температуры этапа отжига составили 70-71°С и 65-67°С, соответственно, при расчетной температуре 59-60°С. Продолжительность этапов не

влияла существенно на величину пороговых температур. Так, ее увеличение с 1 до 10 с плавно снижало температурный предел денатурации на 2-3°С, а предел отжига повышался при этом на те же 2-3°С. Подобное поведение системы объясняется, по-видимому, кинетикой денатурации-отжига НК. Меньшая продолжительность денатурации требует более высокой температуры для расхождения цепей, бо́льшая продолжительность отжига способствует полноценной гибридизации при менее оптимальной (выше расчетной) температуре. Сходные закономерности наблюдались и для других систем праймеров.

Таким образом, для сближенных праймеров нет необходимости задавать максимальную температуру денатурации (95°С) и расчетную температуру отжига. Праймеры "встык" позволяют существенно сократить продолжительность амплификации за счет уменьшения времени, необходимого прибору для термоциклирования. Так, минимальная продолжительность ПЦР с использованием праймеров "встык" и с сохранением равной эффективности составила 20 мин (показано на ДНК *A.mellifera*), в то время как при задании стандартной программы она была равна 65-70 мин (для ДНК-амплификатора T100). Выигрыш во времени является важным преимуществом сближенных праймеров, поскольку они обеспечивают быстрое получение достоверного результата, что актуально для клинико-диагностических лабораторий или полевых исследований.

Одной из активно используемых разновидностей ПЦР является аллельспецифическая полимеразная цепная реакция (АС-ПЦР), применяемая для анализа однонуклеотидных полиморфизмов – снипов (SNP) [Wu et al., 1989]. Как правило, для проведения АС-ПЦР используется ДНК хорошего качества, поскольку ее выделяют из свежих биоматериалов в достаточном количестве. Однако при работе с разрушенной ДНК SNP-анализ становится нетривиальной задачей. Нами изучена возможность дискриминации полиморфных нуклеотидов в ходе АС-ПЦР с использованием сближенных праймеров. В качестве матрицы была взята ДНК пчелы, а праймеры подбирали к короткому участку локуса ХМ006557349, в действительности не несущему SNP. Однонуклеотидную замену моделировали искусственно путем подбора всех четырех возможных аллель-специфических прямых праймеров (ApM aF-A, ApM aF-C, ApM aF-G, АрМ aF-T) (табл. 2.4, №№129-132), которые конструировали согласно правилу, по которому наряду с 3'-концевым дискриминирующим нуклеотидом дополнительно заменяли третий с 3'-конца нуклеотид на некомплементарный матрице [Ребриков и др., 2009]. При этом позиция условного SNP в ДНК несет нуклеотид С на прямой цепи. Было подобрано несколько обратных праймеров, разноудаленных от прямого (табл. 2.4, №№133-136). Праймер ApM aR располагался "встык" по отношению к прямому,

праймеры ApM nR-1, ApM nR-2 и ApM nR-3 отстояли на 1, 2 и 3 нуклеотида соответственно, а ApM R – на длину праймера ApM aR (рис. 3.13).



Рис. 3.13. Схема расположения сближенных праймеров, использованных для модельного SNP-типирования.

Минимальный размер ампликона обеспечивала пара ApM aF/ApM aR (38 п.о.). В данном случае 3'-концы праймеров максимально сближены и не образуют нуклеотидного промежутка (gap). ПЦР-амплификация, проведенная с данной парой праймеров, не позволила выявить полиморфный нуклеотид: наработка ампликона наблюдалась для аллеля G (праймер ApM aF-G), в то время как целевой продукт амплификации, соответствующий аллелю C (ApM aF-C), не образовывался (рис. 3.14A). Предположили, что отсутствие специфичности обусловлено максимальным сближением праймеров. Для подтверждения данного предположения была проведена AC-ПЦР с обратными праймерами ApM nR-1, ApM nR-2 и ApM nR-3, отстоящими от прямых праймеров на 1, 2 и 3 нуклеотида соответственно.



Рис. 3.14. Электрофореграммы результатов аллель-специфичной ПЦР с использованием праймеров "встык" к ДНК *A.mellifera* (M – маркер pUC19/MspI). (A) праймер ApM aR, дорожки: 1 – аллель A, 2 – C, 3 – G, 4 – T. (Б) праймер ApM nR-3, дорожки: 1 – аллель A, 2 – C, 3 – G, 4 – T. (В) праймер ApM R, дорожки: 1, 5 – аллель A, 2, 6 – C, 3, 7 – G, 4, 8 – T, 1-4 – опыт, 5-8 – ОК (стандартные условия амплификации).

В этом случае наряду с образованием целевого продукта для аллеля С нарабатывался также продукт и для аллеля G, т.е. желаемая специфичность все равно не

была достигнута (на рис. 3.14Б в качестве примера приведен результат для ApM nR-3). Следовательно, введение нуклеотидной бреши размером 1-3 нт, хотя и изменило ход АС-ПЦР, не обеспечило аллель-специфичности. Дальнейшее отдаление обратного праймера на 4, 5 и т.д. нуклеотидов посчитали нецелесообразным, поскольку длина ампликона при этом возрастает незначительно, а повышение специфичности не гарантировано. Поэтому был использован обратный праймер ApM R, отстоящий от прямого на длину целого праймера ApM aR. После оптимизации параметров реакции амплификация в паре АрМ aF/ApM R привела к требуемому результату: повышение температуры отжига на 4°С (63 вместо 59°С) и уменьшение продолжительности этапов денатурации, отжига и элонгации до 1, 5 и 1 с, соответственно, благоприятным образом сказались на эффективности и специфичности амплификации (рис. 3.14В). Таким образом, для успешного протекания АС-ПЦР необходимо, по-видимому, некоторое отдаление прямого и обратного праймеров друг от друга, поскольку расположение "встык" или с зазором в несколько нуклеотидов не обеспечило требуемой специфичности реакции. В то же время отдаление праймеров на 18 нт позволило дискриминировать полиморфный нуклеотид. Исследование применимости сближенных праймеров для проведения АС-ПЦР требует дальнейшего более детального изучения.

Далее было изучено протекание ПЦР-амплификации разрушенной ДНК, в качестве которой использовали модельные препараты: ДНК пчелы медоносной, подвергнутые действию ультрафиолетового света (УФ), уксусной кислоты и УЗ. УФ-излучение приводит к образованию в ДНК ковалентно сшитых димеров азотистых оснований, а также к фоторасщеплению ДНК, и его часто используют для обеззараживания рабочего пространства и отдельных компонентов ПЦР-смесей [Champlot et al., 2010; Чемерис и др., 2012]. Кислоты (pH<3) гидролизуют ДНК, расщепляя фосфодиэфирные и N-гликозидные связи. УЗ вызывает разрывы цепей ДНК с образованием фрагментов, размер которых зависит от интенсивности и продолжительности воздействия. Электрофоретический анализ образцов после ПЦР показал, что все три воздействия негативно влияют на образование "классических" продуктов, в то время как при использовании праймеров "встык" целевые ампликоны успешно нарабатывались для разрушенной ДНК, за исключением образца, обработанного кислотой (рис. 3.15).

Наибольшее количество целевого продукта получено с ДНК, разрушенной УЗ, который вызывает преимущественно механическое разрушение ДНК, благодаря чему возможен полноценный отжиг праймеров, а при близком их расположении – образование целевого ампликона.



Рис. 3.15. Электрофореграмма результатов ПЦР-амплификации разрушенной ДНК (10⁴ копий мишени, стандартные условия ПЦР): "+" – положительный контроль; "-" – отрицательный контроль (с использованием в одной реакционной смеси обеих пар праймеров AM F/AM R и AM aF/AM aR); УФ – воздействие ультрафиолетовым светом; рН – обработка кислотой; УЗ – фрагментация ультразвуком; М – маркер pUC19/MspI.

3.2.2. Оценка чувствительности ПЦР с праймерами "встык"

При проведении ПЦР-амплификации с праймерами "встык" заметили, что они обеспечивают более высокую чувствительность реакции. Так, при использовании праймеров к ДНК человека наблюдается образование ампликонов в образцах ОК уже к 30 циклу (рис. 3.16А, дорожки 1 и 2). При тех же условиях для более удаленных праймеров к ДНК человека (ампликоны длиной 80 п.о. и выше) в образцах ОК продукты амплификации не выявляются электрофорезом (рис. 3.16А, дорожки 3 и 4). Секвенирование самого короткого ампликона (рис. 3.16А, дорожка 1) показало, что он является продуктом специфичной амплификации, а не димеризации праймеров.



Рис. 3.16. ПЦР со сближенными праймерами (стандартные условия ПЦР): (А) ДНК человека (10³ копий мишени) и праймеры (HS) к ней, (Б) ДНК пчелы медоносной (10³ копий мишени) и праймеры (AM) к ней. Дорожки 1-4 – отрицательный контроль; 5-8 – опыт; 1, 5 – пара aF/aR; 2, 6 – пара aF/nR1; 3, 7 – пара aF/nR2; 4, 8 – пара aF/nR3; M1 – маркер 100 п.о., M2 – маркер pUC19/MspI.

Найдено, что с праймерами HS aF/HS aR для 10³ копий ДНК-мишени детектируемое количество ампликонов в опытных образцах нарабатывается, начиная с 23-24 цикла ПЦР, а для контрольных образцов – с 27-28 цикла. Таким образом, хотя скорость накопления ампликонов разная, к 30-му циклу реакции они имеются и в опытных, и в

контрольных образцах. Получение подобного результата объяснимо, поскольку ДНК человека широко представлена в окружающем пространстве. Она также присутствует в реактивах, используемых для ПЦР: праймерах, дНТФ, полимеразах и пр. Ранее неоднократно была показана высокая вероятность получения ложноположительных результатов в ПЦР с праймерами к ДНК человека, если не предпринимать чрезвычайных мер для удаления ДНК [Чемерис и др., 2012]. В данной работе мы не предпринимали особых усилий для очистки рабочего пространства и реактивов от человеческой ДНК. Для аналогичной системы сближенных праймеров к ДНК пчелы ПЦР-амплификация привела к образованию только специфичных продуктов амплификации (рис. 3.16Б).

Интересным оказалось протекание ПЦР со сближенными праймерами к ДНК богомола обыкновенного, размер генома которого сопоставим с человеческим [Koshikawa et al., 2008]. На рисунке 3.17 приведен пример амплификации фрагмента однокопийного гена "бескрылости" богомола обыкновенного *Wnt-1* (FJ802922.1) с использованием двух пар праймеров (табл. 2.4, №№105-108): "встык" (MR aF/MR aR) и с традиционным расположением (MR F/MR R). При использовании праймеров "встык" образцы ОК не показывали подъема даже после 60 цикла (рис. 3.17А), в то время как для "традиционных" праймеров такой подъем наблюдался, видимо, вследствие образования неспецифических продуктов (рис. 3.17Б). Данный феномен объясняется, видимо, тем, что при подборе праймеров "встык" проводится *in silico* анализ всей короткой амплифицируемой последовательности, в том числе на возможность образования гомо- и гетеродимеров праймеров, в то время как при подборе праймеров с традиционным удалением определение гомологии с внутренней (не покрываемой праймерами) нуклеотидной последовательностью не производится.

Повышение специфичности амплификации при использовании праймеров "встык" особенно важно при количественном определении НК. В случае низкокопийных мишеней, когда величина порогового цикла Ct для опытных образцов окажется велика, она может стать близкой или совпасть с Ct для OK, и тогда станет невозможным точное установление количества мишени в образце. В приведенном примере ДНК насекомого была взята в серийных разведениях из расчета содержания в образцах 10^4 , 10^3 , 10^2 и 10^1 копий мишени на реакцию. Использование сближенных праймеров позволило выявить единичные копии мишени (<10), в то время как для классических праймеров предел обнаружения составил 10^2 копий. Кривые плавления показали образование в опытных образцах специфических ампликонов для обеих пар, однако для классических праймеров происходит наработка неспецифических продуктов в OK (рис. 3.17В и Г).



Рис. 3.17. Чувствительность ПЦР в реальном времени (ДНК *M. religiosa*, стандартные условия ПЦР). (A, B) – праймеры встык (MR aF/MR aR), (Б, Г) праймеры с традиционным расположением (MR F/MR R). A, Б – кривые амплификации (указано количество копий мишени (10⁴, 10³, 10², 10¹), ОК – отрицательный контроль), В, Г – кривые плавления.

3.2.3. Влияние ингибиторов на ПЦР со сближенными праймерами

Известно, что некоторые органические соединения эффективно ингибируют амплификацию НК. Вероятно, одним из способов решения этой проблемы может стать использование праймеров "встык", которые приводят к продуктам малого размера и обеспечивают тем самым более высокую скорость наработки целевых ампликонов. Для оценки характера протекания ПЦР со сближенными праймерами в присутствии ингибиторов были использованы по две пары праймеров: "встык" и с "классическим" расположением, подобранные к ДНК лиственницы сибирской и богомола обыкновенного. Данные пары тестировали в ПЦР-экспериментах с препаратами ДНК, содержащими ингибирующие агенты.

Лиственница – представитель класса хвойных растений, характеризующихся высоким содержанием фенольных соединений и терпеноидов, обладающих значительной ПЦР-ингибирующей способностью. При выделении ДНК из хвои *L. sukaczewii* ЦТАБметодом препараты содержат примеси этих соединений. ПЦР-анализ данного образца с праймерами к высококопийной последовательности внутреннего транскрибируемого спейсера 1 (*ITS1*) эффективно протекал только для праймеров "встык" (рис. 3.18, табл. 3.5). Праймеры "встык" позволили обнаружить ДНК *L. sukaczewii* почти во всем диапазоне 10-кратных разведений, но линейности значений Сt не наблюдалось (табл. 3.5).



Рис. 3.18. Ингибирование ПЦР с ДНК лиственницы *L. sukaczewii* (каждая кривая соответствует одному из двух повторов для 10-кратных серийных разведений ДНК). (А) кривые 1, 3, 5, 7, 9, 11 – праймеры "встык" (LS aF/LS aR); кривые 2, 4, 6, 8, 10, 12 – "классические" праймеры (LS F/LS R). (Б) электрофореграмма результатов ПЦР, номера дорожек соответствуют номерам кривых (М – маркер pUC19/MspI).

Таблица 3.5. Влияние расположения праймеров на величину пороговых циклов Ct, 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	Ис	Примерное	Пороговый цикл Ct (номер кривой/дорожки)						
ДНК,	еден	число копий	метод выде.	ления №1**	метод выделения №2**				
ΗΓ	Pa3B	мишени*	LS aF/LS aR	LS F/LS R	LS aF/LS aR	LS F/LS R			
20	100	1000	19,0±1,0 (1)	- (2)	22,0±1,0	24,0±0,0			
2	10-1	100	27,5±1,0 (3)	36,0±2,0 (4)	25,0±1,0	28,0±1,0			
0,2	10-2	10	31,0±2,0 (5)	40,0±3,5 (6)	28,5±1,0	31,5±2,0			
0,02	10-3	1	38,0±4,0 (7)	44,5±4,5 (8)	35,0±3,0	37,0±3,0			
0,002	10-4	0,1	- (9)	45,5±4,0 (10)	_	40,0±3,0			
0	—	0	-(11)	45,5±5,0 (12)	_	41,5±4,0			

* указан порядок величины.

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

ПЦР с классической парой праймеров (LS F - LS R) полностью ингибируется при использовании ДНК высокой концентрации, не наблюдалось накопления даже неспецифических продуктов. ПЦР протекала только со слегка разбавленными образцами ДНК (10⁻¹ и 10⁻²), но значения Сt в этом случае были гораздо выше по сравнению с аналогичными образцами, содержавшими праймеры "встык". Для ПЦР-образцов с низкой концентрацией ДНК получены значения Ct, близкие к Ct для OK. Учитывая высокую

копийность *ITS1*, эти данные демонстрируют очень низкую эффективность ПЦР с классическими праймерами. В сравнительных экспериментах с ДНК лиственницы, выделенной с помощью коммерческого набора, заметного ингибирования не наблюдалось.

В другом эксперименте, проведенном с ДНК *M.religiosa*, было показано ингибирующее действие плазмы крови человека, содержавшей гем в концентрации 12 мкМ (рис. 3.19). Для амплификации использовали пару праймеров "встык" (MR aF/MR aR) и с традиционным расположением (MR F/MR R).



Рис. 3.19. Электрофореграмма результатов ПЦР-амплификации ДНК *M.religiosa* с добавлением в ПЦР-смесь плазмы крови человека, содержащей 12 мкМ гема: 1 – контроль без ДНК и без плазмы, 2 – контроль без плазмы, 3 – 0,1% плазмы (об.), 4 – 1%, 5 – 10%, М – маркер pUC19/MspI (стандартные условия ПЦР; пары праймеров MR aF/MR aR, продукт длиной 42 п.о., и с традиционным расположением MR F/MR R, продукт длиной 252 п.о.).

ПЦР с праймерами "встык" оказалась менее чувствительна к ингибирующему действию гем-содержащего препарата плазмы. При 1%-ном содержании плазмы наблюдалось ингибирование амплификации в ПЦР-образцах с обычными праймерами, тогда как в образцах, содержавших праймеры "встык", целевые продукты амплификации успешно нарабатывались. При 10%-ном содержании плазмы происходило полное ингибирование реакции для обеих пар праймеров. В то же время присутствие небольшого количества плазмы (0,1%) в обоих случаях приводило к повышению эффективности ПЦР. Также было оценено протекание ПЦР со сближенными праймерами в присутствии мочевины, гидрохинона, интеркалирующего красителя SYBR Green I (SGI) и холевой кислоты. Во всех случаях праймеры "встык" обеспечили амплификацию ДНК в присутствии таких количеств ингибирующих агентов, при которых ПЦР с "традиционно" расположенными праймерами не протекала (данные не приведены).

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

3.3. ДИМЕРИЗАЦИЯ ПРАЙМЕРОВ В УСЛОВИЯХ ПЦР

Специфичность реакций амплификации НК определяет степень достоверности получаемого результата и диагностическую значимость методов, поэтому одной из основных задач является предотвращение синтеза нежелательных (побочных) продуктов амплификации. Низкая специфичность может быть обусловлена неоптимальной структурой праймеров, приводящей к относительно стабильным гомо- и гетеродимерам, способным удлиняться полимеразой и накоплению так называемых димеров праймеров (ПД). Считается, что для подобной димеризации не требуется НК-матрица, поэтому характер накопления ПД схож для любых праймерных систем.

3.3.1. Влияние структуры праймеров на эффективность димеризации

Сближенные праймеры обеспечивают наработку специфических ампликонов, размер, подвижность в геле и температура плавления (Tm) которых практически идентичны таковым у ПД. Анализ результатов амплификации методом гельэлектрофореза или в режиме реального времени становится в этом случае затруднительным или невозможным (за исключением вариантов с использованием флуорогенных зондов). При использовании праймеров с обычным расположением исследователи нередко игнорируют димеризацию, так как анализ или выделение специфических ампликонов не представляет сложности, а результаты неспецифической амплификации могут не приниматься во внимание.

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 (табл. 2.5, №№137-168). Пара F0/R0 не образует димерные вторичные структуры ("качественные" праймеры); F1/R1, F2/R2 и F3/R3 содержат на 3'-концах один, два или три комплементарных нуклеотида, "низкого" качества), соответственно (праймеры которые могут обеспечивать перекрывание 3'-концов и образование гетеродимеров (рис. 3.20А). 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. Среди них самый стабильный гетеродимер дает пара F3a/R3a ($\Delta G = -6,14$ ккал/моль), наименее стабильный пары F2b/R2b и F2c/R2c (-1,60 и -1,94 ккал/моль). Были сконструированы соответствующие короткие одноцепочечные ДНК-матрицы ТО, Т1, Т2 и Т3, обеспечивающие максимальное сближение праймеров при отжиге (рис. 3.20Б), а также

более протяженная универсальная одноцепочечная ДНК-матрица Т100, на которой все праймеры отжигаются по ее концам, давая продукт размером около 100 п.о.



Рис. 3.20. Система "димеризующихся" праймеров. (А) отжиг праймеров на матрицах и друг на друге ("димеризация"). (Б) Отжиг праймеров на коротких и универсальной матрицах.

Структуры праймеров и матриц были подобраны таким образом, чтобы полностью исключить гомологичность с любыми известными геномными последовательностями и обеспечить образование гетеродимеров, но не гомодимеров и шпилек. Поскольку исходные ДНК-матрицы являются одноцепочечными, на первом этапе реакции отжигается и удлиняется только один из праймеров, после чего запускается обычная ПЦР. Праймеры в парах 1, 2 и 3 имеют комплементарные 3'-концевые нуклеотиды, поэтому они могут отжигаться и на соответствующих матрицах, и образовывать гетеродимеры.

Известно, что праймеры с более чем двумя 3'-перекрывающимися нуклеотидами могут обеспечить эффективное накопление ПД. ПЦР-эксперименты показали, что F0/R0 и обе пары F1/R1 не образуют димерных продуктов даже после длительной (>40 циклов) амплификации (табл. 3.6, столбец 1; рис. 3.21А и 3.21Б, дорожки 3 и 6).



Рис. 3.21. ПЦР с модельными парами праймеров (10³ копий соответствующих ДНКматриц, 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 Т100, 3 – отрицательный контроль.

Среди группы праймеров F2/R2 слабое накопление ПД замечено только для пары F2a/R2a после 40 цикла реакции для образцов, содержащих T100 (табл. 3.6, столбец 1; рис. 3.21B, дорожка 5). В отличие от других наборов, димеризация преобладала над образованием специфического продукта для всех пар F3/R3 (рис. 3.21Г, дорожка 2, в качестве примера показана пара F3a/R3a), а длительная амплификация приводила к ПД и в образцах ОК (рис. 3.21Г, дорожка 6). Наиболее стабильный гетеродимер (F3a/R3a) обеспечивал более эффективное накопление ПД в опытных образцах (рис. 3.21Г, дорожки 2 и 5) по сравнению с ОК (рис. 3.21Г, дорожки 3 и 6). Таким образом, впервые показано, что присутствие молекул ДНК-матрицы ускоряет образование ПД.

		Варианты проведения ПЦР											
		1		2				3		4			
Праймеры	станда	артные усл	овия	повышенная температура				короткое		горячий старт***			
пранмеры				отжига праймеров			термоцин	слирование	e (1-5-1 c)				
	матрица*	матрица	ОК**	матрица	матрица	ОК	матрица	матрица	ОК	матрица	матрица	ОК	
		T100			T100			T100			T100		
F0/R0	30,1±0,5	31,2±0,4	-	34,0±0,6	33,8±0,5	-	31,2±0,4	33,1±0,5	-	30,9±0,4	30,8±0,5	-	
F1a/R1a	31,2±0,5	30,2±0,8	-	34,2±0,7	34,1±0,5	-	31,4±0,5	32,6±0,5	-	31,0±0,5	30,8±0,5	-	
F1b/R1b	30,4±0,4	31,3±0,4	-	34,2±0,6	34,2±0,6	-	31,4±0,5	32,3±0,8	-	31,0±0,4	31,9±0,5	-	
F2a/R2a	28,6±0,8	27,7±0,4	37,2±0,6	35,9±0,4	36,4±0,7	38,7±0,5	29,4±0,8	31,3±0,5	38,5±0,7	28,3±0,5	28,7±0,8	-	
F2b/R2b	29,2±0,5	28,2±0,5	-	36,2±0,7	36,2±0,5	-	31,1±0,6	31,0±0,5	-	27,8±0,7	29,2±0,5	-	
F2c/R2c	30,3±0,6	28,1±0,5	-	35,8±0,4	37,1±0,5	-	32,2±0,3	30,7±0,5	-	29,7±0,6	29,4±0,8	-	
F3a/R3a	27,9±0,5	28,2±0,6	32,5±0,5	36,5±0,5	35,2±0,4	36,4±0,5	31,6±1,2	31,9±0,8	33,2±0,6	29,9±0,4	31,3±0,2	39,6±0,5	
F3b/R3b	28,0±0,7	27,8±0,9	33,6±0,9	35,7±0,6	36,3±0,4	39,5±0,3	32,4±0,5	31,8±0,5	33,3±0,7	28,6±0,7	30,6±0,9	44,6±0,7	
F3c/R3c	28,5±1,1	31,3±0,5	36,1±0,2	36,5±0,5	37,0±0,4	39,1±0,7	33,2±1,1	30,8±1,1	37,7±0,8	30,5±0,4	30,4±0,6	-	
F3d/R3d	28,3±0,4	30,1±0,7	38,5±0,4	38,6±0,5	37,1±0,3	42,5±0,5	32,5±0,7	32,5±0,7	41,5±0,9	30,3±0,7	31,1±0,7	-	

Таблица 3.6. Влияние условий ПЦР с "димеризующимися" праймерами на величину порогового цикла Сt (10⁵ копий ДНК-матрицы).

* соответствующие матрицы Т0-Т3. ** ОК – отрицательный контроль. *** приведены данные для ДНК-полимеразы Q5 Hot Start.

Чтобы выяснить, являются ли самые короткие ампликоны специфическими продуктами или ПД, была определена их первичная структура. Для этого продукты, полученные амплификацией матриц T0-T3, и ПД, выделенные из гелей после амплификации T100, клонировали и секвенировали. Для пар F0/R0, F1/R1 и F2/R2 получены клоны только с последовательностями целевых продуктов (рис. 3.22, последовательности 2, 4, 6, 8, 10, 12).

	Вектор ——>	Вставка 🔶	Вектор ←	
1	AGACATT	CCTCTTGCTTTCGCTCTCGTTCTTTACAGAACACAGAGAGAGAAGAAGACAA CCTCTTGCTTTCGCTCTCGTTCTTTACAGAACACAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGA	AATGTCTG	Т0 Специфический продукт с F0/R0
2	momenti		anoicio	споцифи неокии продуки от олно
3		CCTCTTGCTTTCGCTCTCGTTCTTTCCACAGAACACAGACGAGAAGAAGACC		T1a
4	AGACATT	CCTCTTGCTTTCGCTCTCGTTCTTTCCACAGAACACAGACGAGAAGAAGACC-	AATGTCTG	Специфический продукт с F1a/R1a
5	1	CCTCTTGCTTTCGCTCTCGTTCTTTTTACAGAACACAGACGAGAAGAAGACC		T1b
6	AGACATT	CCTCTTGCTTTCGCTCTCGTTCTTTTTACAGAACACAGACGAGAAGAAGACC-	AATGTCTG	Специфический продукт с F1b/R1b
7		TCTTGCTTTCGCTCTCGTTCTTTCCCCACAGAACACAGACGAGAAGAAGAA		T2a
8	AGACATT	TCTTGCTTTCGCTCTCGTTCTTTCCCCACAGAACACAGACGAGAAGAAGAACA-	AATGTCTG	Специфический продукт с F2a/R2a
9		TCTTGCTTTCGCTCTCGTTCTTTCTCTACAGAACACAGACGAGAAGAAGAA		T2b
10	AGACATT	TCTTGCTTTCGCTCTCGTTCTTTCTCTACAGAACACAGACGAGAAGAAGAC	AATGTCTG	Специфический продукт с F2b/R2b
11		TCTTGCTTTCGCTCTCGTTCTTTTTTACAGAACACAGACGAGAAGAAGAA		T2c
12	AGACATT	TCTTGCTTTCGCTCTCGTTCTTTTTTACAGAACACAGACGAGAAGAAGAAGAC	AATGTCTG	Специфический продукт с F2c/R2c
13		TGCTTTCGCTCTCGTTCTTTCCCCCCACAGAACACAGACGAGAAGAAGA		ТЗа
14	AGACATT	TGCTTTCGCTCTCGTTCTTTCCCCCCACAGAACACAGACGAGAAGAAGA	AATGTCTG	Специфический продукт с F3a/R3a
15	AGACATT	TGCTTTCGCTCTCGTTCTTTCCCCACAGAACACAGACGAGAAGAAGA	AATGTCTG	Димер праймеров F3a/R3a
16	AGACATT	TGCTTTCGCTCTCGTTCTTTCCCACAGAACACAGACGAGAAGAAGA	AATGTCTG	Димер праймеров F3a/R3a
17		TGCTTTCGCTCTCGTTCTTTCTCCTCACAGAACACAGACGAGAAGAAGA		ТЗЬ
18	AGACATT	TGCTTTCGCTCTCGTTCTTTCTCCTCACAGAACACAGACGAGAAGAAGA	AATGTCTG	Специфический продукт с F3b/R3b
19	AGACATT	TGCTTTCGCTCTCGTTCTTTCTCACAGAACACAGACGAGAAGAAGA	AATGTCTG	Димер праймеров F3b/R3b
20		TGCTTTCGCTCTCGTTCTTTCTTTCTTACAGAACACAGACGAGAAGAAGA		T3c
21	AGACATT	TGCTTTCGCTCTCGTTCTTTCTTCTTACAGAACACAGACGAGAAGAAGA	AATGTCTG	Специфический продукт с F3c/R3c
22	AGACATT	TGCTTTCGCTCTCGTTCTTTCTTACAGAACACAGACGAGAAGAAGA	AATGTCTG	Димер праймеров F3c/R3c
23		TGCTTTCGCTCTCGTTCTTTATTATTACAGAACACAGACGAGAAGAAGA		T3d
24	AGACATT	TGCTTTCGCTCTCGTTCTTTATTATTACAGAACACAGACGAGAAGAAGA	AATGTCTG	Специфический продукт с F3d/R3d
25	AGACATT	TGCTTTCGCTCTCGTTCTTTATTACAGAACACAGACGAGAAGAAGA	AATGTCTG	Димер праймеров F3d/R3d

Рис. 3.22. Нуклеотидные последовательности ампликонов, полученных на основе "димеризующихся" праймеров (T0, T1, T2 и T3 – последовательности ДНК-матриц).

Все пары F3/R3 приводили к ПД (рис. 3.22, 15, 16, 19, 22, 25) наряду со специфическими ампликонами (рис. 3.22, последовательности 14, 18, 21, 24) при амплификации матрицы Т3. Последовательности ПД, полученные после амплификации T100 с использованием F3/R3, совпадали с ПД, полученными в отсутствие этой матрицы. Примечательно, что для F3a/R3a выявлялись клоны как с тремя, так и четырьмя последовательными dC, что свидетельствует о неполном перекрывании 3'-концов на стадии отжига праймеров (рис. 3.22, последовательности 15 и 16).

Описано несколько способов предотвращения димеризации праймеров. Один из простейших способов основан на задании более высокой температуры отжига праймеров (на >5°C выше расчетной), однако для использованной в работе модельной системы он не

обеспечил удовлетворительного результата (табл. 3.6, столбец 2). Повышение температуры отжига привело к увеличению значений Сt для тестовых образцов, что снизило достоверность результатов. Таким образом, данный подход не может считаться универсальным способом предотвращения димеризации и может применяться только в частных случаях. Второй способ заключался В использовании короткого термоциклирования, однако и этот прием не оказал заметного влияния на качество ПЦР (табл. 3.6, столбец 3). Наиболее популярным способом повышения специфичности ПЦР является использование ДНК-полимераз, активирующихся при нагревании реакционной смеси ("горячий старт"). В данном исследовании апробировали две такие ДНКполимеразы (Q5 и Maxima). Оба фермента показали сходные результаты и позволили исключить образование ПД, но только для пар F2a/R2a, F3c/R3c и F3d/R3d, которые образуют нестойкие гетеродимеры (табл. 3.6, столбец 4). К сожалению, для пар F3a/R3a и F3b/R3b, формирующих наиболее стабильные гетеродимеры, использование ДНКполимераз "горячего старта" не позволило устранить ПД, хотя эффективность неспецифической амплификации все же снижалась.

3.3.2. Влияние матрицы на димеризацию праймеров

Далее изучали димеризацию праймеров в ПЦР с использованием геномной ДНК. Для этого амплифицировали фрагмент однокопийного гена "бескрылости" богомола обыкновенного *Wnt-1* (FJ802922.1) с помощью двух пар праймеров "встык": без комплементарных 3'-концевых нуклеотидов (MR aF/MR aR) и с 3'-перекрывающимися динуклеотидами 5'-AG-3' и 5'-CT-3' (MR aF2/MR aR2) (табл. 2.5, №№169-173). Обе пары приводят к специфическим ампликонам одинакового размера (46 п.о.). Также были сконструированы две пары праймеров с традиционным удалением: без комплементарных 3'-концевых нуклеотидов, специфический продукт длиной 252 п.о. (MR F/MR R) и с 3'перекрывающимися динуклеотидами 5'-GA-3' и 5'-TC-3', специфический продукт длиной 253 п.о. (MR aF2/MR R2). Расчеты показали, что обе пары праймеров низкого качества образуют неустойчивые 3'-гетеродимеры ($\Delta G = -1,6$ ккал/моль для обеих пар).

При проведении ПЦР-РВ для пары MR aF2/MR aR2 наблюдали подъем кривых как в опытных образцах, так и в образцах OK, в то время как для праймеров "встык", не залипающих 3'-концами – только в опытных образцах (рис. 3.23А).



Рис. 3.23. 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 – 10³), 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.

В первом случае кривые характеризовались бо́льшей сглаженностью и меньшими значениями величины Ct, что свидетельствует, видимо, о параллельном протекании амплификации не только целевой ДНК-мишени, но и димера. Отсутствие подъема кривых в образцах OK 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. 3.23Б). 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. 3.23В и 3.23Г).

Амплификаты после ПЦР в реальном времени дополнительно анализировали с помощью гель-электрофореза. Из двух пар праймеров "встык" только вторая, в которой праймеры способны отжигаться друг на друге, приводила к образованию продукта димеризации длиной 44 п.о. (рис. 3.23Д). Аналогичный результат был получен и для пар праймеров с традиционным удалением: только пара MR aF2/MR R2 при длительной амплификации привела к образованию димера (рис. 3.23Е).

При исследовании димеризации праймеров неоднократно замечали, что в присутствии ДНК-матриц она протекает эффективнее. Для более детального изучения этого феномена были проведены эксперименты, в которых комбинировали различные праймеры и ДНК. Дополнительно к имевшимся были сконструированы новые пары L aF/L aR2, L F2/L aR2, L aF/L aR и L F/L aR2, специфичные к ДНК фага λ (табл. 2.5, №№174-178). Использовали праймеры, содержавшие два комплементарных 3'-концевых нуклеотида (пары F2b/R2b, MR aF2/MR aR2, MR aF2/MR R2, L aF/L aR2 и L F2/L aR2) и не содержавшие таковых (F0/R0, MR aF/MR aR, MR F/MR R, L aF/L aR и L F/L aR2). Высокая специфичность ПЦР наблюдалась для качественных праймеров "встык", в то время как качественные праймеры с традиционным расположением (MR F/MR R, L F/L aR2) во многих случаях обеспечивали накопление продуктов и в ОК (табл. 3.7). Наиболее интересные результаты были получены для праймеров низкого качества, для которых наработка ампликонов протекала не только в ОК, но и в ложноположительных контролях, не содержавших специфической ДНК-мишени, но содержавших фоновую ДНК. Пара F2b/R2b приводила к неспецифической амплификации в присутствии двуцепочечной геномной ДНК (ДНК M. religiosa и λ), хотя в отсутствие какой-либо мишени не давала побочных продуктов. Полученные данные свидетельствуют о том, что любая геномная ДНК ускоряет димеризацию праймеров, а также образование недимерных побочных продуктов даже для праймеров, которые не образуют этих продуктов в отсутствие ДНК. Причина этого явления остается неясной и требует проведения более детальных исследований. Вероятно, дцДНК образует с полимеразой слабый промежуточный фермент-субстратный комплекс, который способствует случайному отжигу 3'-концевого мотива праймеров и тем самым ускоряет синтез неспецифических продуктов.

	расположение	праймеры	матрица	ДНК	ДНК λ	ОК
	праймеров		T100	M. religiosa		
:		F0/R0	31,1±0,5	-	-	-
HHBIC	"встык"	MR aF/MR aR	-	28,2±0,6	-	-
твен		L aF/L aR	-	-	26,5±0,5	-
качес	стандартное	MR F/MR R	33,2±0,5*	26,9±0,5	35,4±0,7	33,6±0,4
=	расположение	L F/L aR2	-	-	26,2±0,4	-
"вэс		F2b/R2b	28,5±0,6	34,8±0,3	33,5±0,5	-
эщие	"встык"	MR aF2/MR aR2	28,5±0,4	26,4±0,5	30,1±0,5	31,2±0,4
меризаую		L aF/L aR2	32,4±0,4	31,4±0,4	25,5±0,4	32,3±0,6
	стандартное	MR aF2/MR R2	33,2±0,4	27,2±0,4	29,6±0,5	33,2±0,6
ид"	расположение	L F2/L aR2	34,1±0,5	32,8±0,6	25,2±0,6	35,2±0,6

Таблица 3.7. Влияние расположения и качества праймеров на величину порогового цикла Ct (мин) (10⁵ копий ДНК-мишени, стандартные условия ПЦР).

* значения Сt для неспецифической амплификации выделены жирным шрифтом.

Таким образом, 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".

3.4. НЕСПЕЦИФИЧЕСКАЯ ИЗОТЕРМИЧЕСКАЯ АМПЛИФИКАЦИЯ (МУЛЬТИМЕРИЗАЦИЯ)

При разработке новых способов обнаружения специфических НК, основанных на изотермической амплификации, обратили внимание, что при попытке провести такую амплификацию в некоторых нетипичных реакционных системах весьма часто образуются побочные ДНК-продукты. Это объясняется тем, что для осуществления изотермической амплификации применяют ДНК-полимеразы с цепь-вытесняющей активностью (цв-ДНК-пол), которые обеспечивают более эффективное накопление нежелательных ампликонов в отсутствие мишени вследствие большей вероятности фальш-праймирования, обусловленного в целом более низкотемпературным режимом реакции. Понимание причин протекания неспецифического ДНК-синтеза позволит разрабатывать более точные методы изотермической амплификации.

3.4.1. 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 олигонуклеотидные матрицы с искусственными нуклеотидными последовательностями размером 40-100 нт, а также прямой (F) и обратный (R) праймеры к ним (табл. 2.6, № 179-286). В качестве контрольной реакции использовали амплификацию катящимся кольцом (АКК) в варианте рамификации; для этого из ЛМ получали соответствующие кольцевые матрицы (КМ, СТ) с помощью лигирования на поддерживающих пробах S (рис. 3.24). Праймер R отжигается на 3'-конце линейной матрицы или на части кольцевой матрицы и удлиняется ДНК-полимеразой. Далее праймер F отжигается на вновь синтезированной цепи, построенной полимеразой после удлинения R-праймера. В случае ЛМ образование продуктов амплификации достигается за счет MM; в случае АКК праймер R инициирует синтез длинной цепи, которая имеет повторяющуюся последовательность, комплементарную матрице, и множество сайтов для отжига праймера F. Продукты ММ (мультимеры) и АКК (конкатемеры) хорошо визуализируются в гелях в виде лестницы полос, соответствующих ДНК-продуктам с длинами, кратными длине исходной матрицы.



Рис. 3.24. Упрощенная схема получения кольцевых ДНК и изотермической амплификации линейных (LT) и кольцевых (CT) матриц. F/R – праймеры, S – поддерживающая проба, nL – размеры продуктов амплификации.

Было синтезировано несколько систем модельных олигонуклеотидных матриц и праймеров к ним. 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 (рис. 3.25).



Рис. 3.25. Системы модельных олигонуклеотидных матриц и праймеров к ним (А, Б), использованных при изучении мультимеризации.

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". Такой дизайн третьей молекулярной системы был обусловлен необходимостью исключения влияния последовательности праймеров на амплификацию. Для изучения MM брали также пары "димеризующихся" праймеров F1a/R1a, F2a/R2a и F3a/R3a (рис. 3.20A).

Изотермическую амплификацию в большинстве экспериментов вели с помощью ДНК-полимеразы Bst exo- по протоколу, состоящему из следующих температурных этапов: 1) 70° C – 30 c, 2) 65° C – 60 c и 3) 60° C – 2 или 3 часа. Эффективность протекания амплификации выражали в значениях Tt – порогового времени (в минутах), при котором начинался рост кривых флуоресценции, соответствующий началу экспоненциальной стадии реакции (ЭСР).

Сначала изучили возможность и эффективность протекания АКК и ММ с матрицами 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 (рис. 3.26). Данный феномен объясняется, вероятно, жесткостью цепей ДНК и стерическими затруднениями [Joffroy et al., 2019]. В целом, эксперименты показали более ранний рост флуоресценции для образцов, содержавших КМ (малые значения Tt), по сравнению с таковыми с ЛМ (рис. 3.26А).



Рис. 3.26. Влияние размера ДНК-матрицы на протекание изотермической амплификации (данные получены для ДНК-полимеразы Bst LF). (А) Кривые амплификации, полученные после амплификации ЛМ и соответствующих КМ (приведена только одна кривая из трех повторов). (В) Значения Тt, полученные после ММ для матриц LT42-LT60.

Поскольку было обнаружено, что ММ возможна только для относительно коротких ДНК-матриц (50, 55 и 60 нт), далее оценили протекание ММ с использованием матриц LT42-LT60. Все данные матрицы привели к накоплению соответствующих продуктов ММ (рис. 3.26Б). При этом эффективность ММ увеличивалась с ростом длины матрицы, достигнув максимума для LT51. Матрицы размером более 51 нт продемонстрировали немного более низкую скорость инициации ММ по сравнению с LT51.

Далее определили первичную структуру мультимерных продуктов, полученных на основе LT2 (50 нт) и LT4 (60 нт). При клонировании использовали три стратегии с силу того, что в литературных источниках имеются противоречивые данные о количестве и типах нуклеотидов, добавляемых Bst-полимеразой по 3'-концам ампликонов [Zyrina et al., 2007; Guixens-Gallardo et al., 2016]. Поскольку концы ампликонов могут различаться, т. е. быть как тупыми, так и с выступающими нуклеотидами, клонирование осуществляли в двух векторах: Т-подобном векторе pAL2-T, который содержит выступающий нуклеотид dT на 5'-концах, и на основе плазмиды pBlueScript KS (+), расщепленной рестрикционной эндонуклеазой Smal. Клонирование было успешным для обоих векторов, что свидетельствует о наличии в продуктах ММ двуцепочечных ДНК как с тупыми концами, так и с выступающими 3'-dA. Образцы, взятые для секвенирования, представляли собой смесь мультимерных продуктов, поэтому секвенирование проводили для плазмидных ДНК со вставками различной длины (рис. 3.27). Было проанализировано несколько десятков клонов. Единичные вставки (1L) во всех случаях полностью повторяли последовательность матрицы, в то время как мультимерные вставки (≥2L) представляли собой последовательности, состоящие из однонаправленных олигонуклеотидных 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.



Рис. 3.27. Примеры первичной структуры мультимерных продуктов (значения L показывают количество повторов).

Поскольку минимальные значения Tt (соответствуют наиболее раннему началу MM) получены для LT2, дальнейшие эксперименты, посвященные оценке влияния условий реакции на эффективность MM, были проведены с данной матрицей. Сначала оценили влияние концентрации LT2, для чего в реакцию брали разное ее количество (10^{3} - 10^{12} копий). Оказалось, что минимальное количество мишени, необходимое для инициации MM, составляет 10^{5} - 10^{6} молекул, поэтому в последующих экспериментах брали 10^{6} копий матрицы на реакцию.

Очевидно, что компоненты реакционной смеси могут влиять на активность ДНКполимеразы. Для оценки этого влияния тестировали работу четырех Bst-полимераз: Bst LF, Bst 2.0, Bst 2.0 WarmStart (Bst WS) и Bst 3.0 в различных буферах при разной концентрации фермента, ионов Mg^{2+} и SYBR Green I. Также варьировали объем реакционной смеси и оценивали влияние минерального масла на ММ. Амплификацию проводили для всех полимераз в семи разных буферах: Thermopol (рекомендуется для Bst LF), Isothermal (для Bst 2.0 и Bst WS), Isothermal II (для Bst 3.0), Таq (для Таq-полимеразы фирмы Promega), Taq-ME (для Taq-полимеразы фирмы СибЭнзим), и пользовательские буферы №1 и №2. Последние два буфера были приготовлены на основе буфера Thermopol с изменениями рН и ионной силы раствора. Установлено, что наиболее эффективно ММ осуществляется полимеразами Bst 2.0 и Bst 2.0 WS при использовании буферов Isothermal и Taq-ME (табл. 3.8), что связано, вероятно, с повышенным содержанием KCl (50 мМ) в Isothermal, наличием 2-меркаптоэтанола (10 мМ) и бо́льшей концентрацией Трис-HCl (60 соответственно. Как будет показано мМ) В Tag-ME, далее (раздел 3.4.2), восстанавливающие агенты, к которым относится и 2-меркаптоэтанол, способствуют более эффективному протеканию ММ. Повышенное содержание Трис-НСІ обеспечивает более высокую буферную емкость среды, что в условиях активного синтеза новых цепей ДНК, высвобождения пирофосфата и протонов способствует более продолжительной стабилизации рН.

Мультимеры образовывались для всех четырех Bst-полимераз, но состав продуктов немного различался (рис. 3.28А). Наиболее четкие полосы в геле наблюдались для Bst WS. Для полимеразы Bst 3.0 полосы были сильно размыты, раздвоены и отличались по длине от мультимеров, образованных другими полимеразами. Из-за высокого риска образования побочных продуктов производитель ДНК-полимеразы Bst ехо- рекомендует либо разливать реакционную смесь на льду, либо использовать Bst WS. Однако обе эти рекомендации не обеспечили отсутствие мультимеров, что, очевидно, связано с конститутивной способностью фермента вести MM.
Таблица 3.8. Относительная эффективность изотермической амплификации, протекающей под действием ДНК-полимеразы Bst exo- в различных буферах.

Буферы (1 [×])	Bst	LF	Bst	2.0	Bst 2.0 WS		Bst	3.0
	LT2	CT2	LT2	CT2	LT2	CT2	LT2	CT2
Thermopol: 20 мМ Tris-HCl (pH 8,8), 10 мМ (NH4) ₂ SO4, 10 мМ KCl,	-	**	*	**	*	**	-	***
2 мМ MgSO ₄ , 0,1% Triton X-100								
Isothermal: 20 мМ Tris-HCl (pH 8,8), 10 мМ (NH ₄) ₂ SO ₄ , 50 мМ KCl,	***	***	***	****	****	****	**	***
2 мМ MgSO ₄ , 0,1% Tween 20								
Isothermal II: 20 мМ Tris-HCl (pH 8,8), 10 мМ (NH ₄) ₂ SO ₄ , 150 мМ KCl,	-	*	*	*	*	*	*	****
2 мМ MgSO ₄ , 0,1% Tween 20								
Таq: 68.8 мМ Tris-HCl (pH 8,8), 18 мМ (NH ₄) ₂ SO ₄ , 2 мМ MgCl ₂ ,	***	***	**	***	**	***	***	***
0,1% Tween 20								
Taq-ME: 60 MM Tris-HCl (pH 8,8), 25 MM KCl, 1.5 MM MgCl ₂ , 10 MM β-	***	***	****	****	****	****	***	***
меркаптоэтанол, 0,1% Triton X-100								
пользовательский буфер №1: 20 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 10 мМ	-	**	**	**	**	**	-	***
(NH ₄) ₂ SO ₄ , 10 мМ KCl, 2 мМ MgCl ₂ , 0,1% Tween 20								
пользовательский буфер №2: 20 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 10 мМ	-	**	***	*	***	*	-	***
(NH ₄) ₂ SO ₄ , 50 мМ KCl, 2 мМ MgCl ₂ , 0,1% Tween 20								

* Tt > 2 4, ** 1,5 < Tt < 2 4, *** 1 < Tt < 1,5 4, **** Tt < 1,0 4.



Рис. 3.28. Влияние различных факторов на мультимеризацию ДНК (для мишени LT2, 10^6 копий на реакцию). (А) влияние разновидности фермента (объем реакционной смеси 10 мкл, для каждой полимеразы использовался рекомендуемый буфер), (Б) влияние концентрации фермента (объем реакционной смеси 10 мкл, буфер Isothermal), (В) влияние объема реакционной смеси (полимераза Bst 2.0, буфер Isothermal), (Г) влияние концентрации ионов Mg²⁺ (объем реакционной смеси 10 мкл, полимераза Bst 2.0 и буфер Isothermal). М1 – маркер на основе pBlueScript KS (+) / MspI, M2 – маркер 50 п.о. (NEB).

Для исследования влияния прочих компонентов реакционной смеси и условий на эффективность ММ были взяты Bst 2.0 и буфер Isothermal. Оказалось, что образование мультимерных продуктов возможно как при высоких, так и при низких концентрациях фермента. С увеличением концентрации фермента эффективность ММ увеличивалась и повышался выход длинноцепочечных продуктов (рис. 3.28Б). Обнаружено влияние объема реакционной смеси на эффективность ММ: наибольшей она была при объеме 10 мкл, тогда как для бо́льших (>15 мкл) и меньших (5 мкл) объемов эффективность ММ снижалась (рис. 3.28В). Возможно, влияние объема объясняется особенностями перемещения (конвекции) жидкости внутри пробирок: при больших объемах такое движение ускорено, что способствует лучшему перемешиванию и диффузии компонентов реакционной массы. Варьирование концентрации ионов Mg^{2+} в диапазоне от 2 до 25 мМ позволило определить, что ММ протекает при 2-10 мМ содержании Mg^{2+} . Наиболее четкие (дискретные) полосы мультимеров наблюдались для образцов, полученных при $[Mg^{2+}] = 4 \, \text{мM}$ (рис. 3.28Г).

Представляло интерес нахождение температурного оптимума ММ. Для этого проводили эксперименты в градиентном режиме работы амплификатора. Обнаружено, что для Bst exo- мультимеры образуются преимущественно при 55-60°C, а конкатемерные продукты нарабатывались с наибольшей эффективностью при 60-65°C (табл. 3.9).

T, °C	среднее порогово	ое время Tt (мин)
	матрица LT2	матрица СТ2
65,0	-	-
63,3	70,0±2,3	23,9±1,1
60,3	64,8±1,3	24,5±1,0
58,9	60,7±1,0	25,2±0,4
57,3	52,8±1,2	27,1±0,6
55,8	50,6±1,0	29,4±1,9
49,4	-	45,0±1,7
44,9	-	97,8±8,4
41,9	-	-
40,0	-	-

Таблица 3.9. Зависимость величины Tt от температуры (10⁶ копий матриц LT2 или CT2, полимераза Bst 2.0, буфер Isothermal).

Также изучили влияние SYBR Green I (SGI) на MM. Известно, что SGI ингибирует работу многих ДНК-полимераз [Monis et al., 2005; Oscorbin et al., 2016]. Обычно для ПЦР используется 1-кратная концентрация SGI, но амплификация с Bst LF и Bst 2.0 при этом значении концентрации красителя не протекала, поэтому проводили амплификацию при содержании SGI в количестве $0,1\times$, $0,25\times$, $0,5\times$, $0,75\times$, $1\times$, $1,25\times$, $1,5\times$ и $2\times$. Обнаружено, что AKK для Bst LF и Bst 2.0 возможна только при концентрации SGI, равной $0,1\times$ и $0,25\times$, а при значениях выше $0,5\times$ происходит ингибирование реакции (табл. 3.10). В то же время MM протекала только при $0,1\times$ содержании красителя. Оптимальная концентрация SGI, которая позволила амплифицировать KM без образования мультимеров, составила $0,25\times$ для полимеразы Bst LF. Для полимеразы Bst 3.0 образование как специфических, так и неспецифических продуктов оказалось возможным при $>0,25\times$ SGI. При этом MM протекала до концентрации $1,25\times$. Но разница во времени, необходимом для образования как специфических, так и неспецифических продуктов, оказалась достаточной для дискриминации обеих реакций. При концентрации SGI выше $1,5\times$ происходило полное ингибирование амплификации как ЛМ, так и KM для всех полимераз.

Поли-	Матри-							
мераза	ца	0,1×	0,25×	0,5×	0,75×	1×	1,25×	1,5×
Bst LF	LT2	136,7±0,5	-	-	-	-	-	-
Bst LF	CT2	20,0±1,0	31,1±1,9	-	-	-	-	-
Bst 2.0	LT2	134,6±0,7	-	-	-	-	-	-
D 5t 2 .0	CT2	22,0±2,0	29,8±1,2	-	-	-	-	-
Bst 3.0	LT2	91,1±5,1	90,8±4,6	102,8±2,5	109,4±3,5	161,1±1,9	-	-
100 0.0	CT2	26,7±0,0	26,7±0,5	26,7±0,3	30,0±3,3	33,3±0,7	85,0±7,8	-

Таблица 3.10. Влияние SYBR Green I на величину Tt (10^6 копий матриц LT2 и CT2, полимераза Bst 2.0, буфер Isothermal).

Для пар "димеризующихся" праймеров F1a/R1a, F2a/R2a и F3a/R3a образование мультимерных продуктов наблюдалось только в последнем случае, т.е. при наличии трех комплементарных 3'-концевых нуклеотидов. Следовательно, даже в отсутствие матриц праймеры способны обеспечить протекание MM при формировании ими относительно стабильных гомо- или/и гетеродимерных структур.

Вопрос о том, является ли способность вызывать ММ общим свойством цепьвытесняющих ДНК-полимераз, оставался открытым, поэтому далее оценили возможность протекания ММ еще для нескольких широко используемых полимераз с различной термической стабильностью (на примере матрицы LTс и праймеров к ней): фрагмент Кленова, Bsu exo- (оптимум около 30-37°C), Bsm exo- (60-65°C), Vent exo-, 9°Nm, Therminator и Hemo KlenTaq (HKT) (72-75°C), Bst exo- других производителей. Среди перечисленных ферментов НКТ является единственной полимеразой, цепь-вытесняющая активность которой не заявлена производителем, но поскольку НКТ обладает 5' \rightarrow 3' экзонуклеазной активностью, мы предположили, что она обладает такой активностью. Therminator является генно-инженерной формой 9°Nm с повышенной специфичностью. Оценку способности вызывать ММ изучали на матрице LTc, которая в предыдущих экспериментах обеспечила наибольшую эффективность ММ.

У термолабильных полимераз фрагмента Кленова и Bsu exo-, у умеренно термостабильной полимеразы Bsm exo- и у термостабильной полимеразы Therminator способность к MM не была обнаружена. У Bst exo- других производителей (СинГен, Биолабмикс) склонность вести MM проявилась значительно слабее, чем у Bst exoпроизводства NEB. Полимеразы Vent exo- и Hemo KlenTaq MM обеспечили протекание MM в относительно узком интервале температур (рис. 3.29).



Рис. 3.29. Продукты изотермической амплификации, синтезируемые тремя цепьвытесняющими ДНК-полимеразами с наибольшей склонностью к мультимеризации: Vent exo-, 9°Nm и Hemo KlenTaq, в присутствии линейной матрицы LTc (мультимеризация) или кольцевой матрицы CTc (АКК).

Наибольшей склонностью вести неспецифический ДНК-синтез обладает 9°Nm. Данная полимераза оказалась способной нарабатывать продукты даже в отсутствие матрицы (данные не приведены), а наличие линейной ДНК обеспечивало образование мультимеров в широком интервале температур (рис. 3.29). Таким образом, способность вызывать мультимеризацию присуща, по всей видимости, большинству термостабильных и умеренно термостабильных цепь-вытесняющих ДНК-полимераз, у которых температурный оптимум активности близок к температуре, при которой обеспечивается наибольшая эффективность "дыхания" цепей ДНК.

3.4.2. Механизм мультимеризации ДНК

Согласно гипотезе, выдвинутой Wang et al., ММ включает в себя образование псевдоциклической ДНК-структуры, в результате чего происходит удлинение начальной матрицы, и, следовательно, появляются дополнительные сайты для отжига праймеров [Wang et al., 2017]. Проведенное нами секвенирование мультимерных продуктов показало, что они состоят из однонаправленных олигонуклеотидных повторов, практически идентичных по нуклеотидной последовательности матрице. На основе имеющихся данных можно предположить, что ММ протекает следующим образом (рис. 3.30). Сначала

один из праймеров (обозначен как R) отжигается на исходной линейной матрице I и удлиняется ДНК-полимеразой, в результате чего на первом этапе реакции образуется первичный короткий ДНК-дуплекс (этап 1). Далее происходит изгиб свободных 3'-концов и их отжиг на противоположной цепи дуплекса, приводящий к образованию псевдоциклической ДНК-структуры – инициаторного комплекса *Ini* (этап 2).



Рис. 3.30. Схема протекания мультимеризации: отжиг и удлинение праймера R на ДНКматрице I, приводящие к образованию двуцепочечного продукта длиной 1L (этап 1), образование псевдоциклической ДНК-структуры *Ini* (этап 2), элонгация цепей в *Ini*, формирование двуцепочечного продукта длиной 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 полноразмерных ампликонов с тандемными нуклеотидными последовательностями (этапы *i*). Праймер F и комплементарные ему участки показаны черным цветом, праймер R и комплементарные ему участки – серым.

Элонгация *Ini* дает продукт с удвоенной нуклеотидной последовательностью и запускает MM (этапы 3-5, 6). Включение в реакцию второго праймера (обозначен как F) переводит ее в экспоненциальный режим (этапы 6 и i). Запуск MM является, вероятно, случайным и очень редким событием, происходящим в определенных (благоприятных) условиях. Возможно, в реакционной смеси происходит единичный акт, запускающий MM, и в этом случае единственная триггерная вторичная структура инициирует образование мультимерных продуктов определенной длины. Если происходит несколько таких событий (старт MM), различающиеся триггерные структуры инициируют формирование мультимеров с различной длиной мономерного звена.

В предполагаемом механизме ММ наиболее спорным является существование Ini. Для подтверждения его образования был проведен ряд экспериментов. Во-первых, предположили, что причиной изгиба концов ДНК является ионное взаимодействие между фосфатным остовом синтезируемых цепей ДНК с поверхностными аминогруппами полимеразы. Удлинение праймера на матрице должно приводить к образованию нормального двуцепочечного ампликона. Однако за счет "дыхания" ДНК возможно частичное раскручивание концов дуплекса (рис. 3.31, стадии I и II). Для коротких ампликонов такое раскрытие может приводить к взаимодействию положительно заряженных аминогрупп на поверхности глобулы фермента и отрицательно заряженных фосфатных групп ДНК (стадия III). В результате цепь ДНК "обволакивает" молекулу фермента, что приводит к сближению 3'-концов с образованием гетеродимера (стадия IV). Гетеродимерная структура удлиняется полимеразой И образуется продукт с повторяющейся нуклеотидной последовательностью (стадии V и VI), что далее способствует протеканию ММ (стадия VII).

Предлагаемый механизм ММ подтверждается следующими наблюдениями: 1) ММ происходит в диапазоне температур 55-60°С, что близко к оптимуму активности ДНКполимеразы Bst и достаточно для расхождения (денатурации) концов ампликонов, 2) ММ наиболее эффективна для матриц длиной около 50 нт и не протекает для более протяженных матриц (> 60 нт), что удовлетворительно коррелирует с диаметром глобулы фермента (~5 нм), и 3) добавление восстанавливающих агентов, например, дитиотреитола (ДТТ) способствует повышению эффективности ММ. Если приведенный механизм ММ верен, то реакцию можно предотвратить с помощью анионных полиэлектролитов, которые будут конкурировать с ДНК за связывание с полимеразой и экранировать ее от взаимодействия с ДНК (рис. 3.31Б). Например, известно, что анионный полиэлектролит концентрациях, по-видимому, за счет прочного связывания с полимеразой за счет сильнокислотных сульфогрупп [Holodniy et al., 1991].



Рис. 3.31. Механизм мультимеризации: (А) схема неспецифического взаимодействия полимеразы Bst ехо- с ДНК и формирования псевдоциклической ДНК структуры. (Б) экранирование глобулы фермента с помощью полиаспарагиновой кислоты (pAsp).

В качестве модельного анионного полиэлектролита использовали три препарата поли(аспарагиновой) кислоты в виде ее натриевой соли с разной молекулярной массой: pAspI (0,9 кДа), pAspII (3,9 кДа) и pAspIII (6,8 кДа), предоставленных коллегами из Казанского Федерального (Приволжского) Университета (рис. 3.32А). Мы предположили, что, поскольку молекулы pAsp содержат слабокислотные карбоксигруппы, такой полимер

не будет препятствовать координации ДНК с активным центром полимеразы, но затруднит связывание с поверхностью ферментных глобул. Эксперименты показали, что рабочий в условиях изотермической амплификации диапазон концентрации pAsp составляет 0,1-0,01%, поэтому для оценки влияния pAsp на MM брали препараты с содержанием pAsp 0,1, 0,05 и 0,01%. В качестве контроля использовали образцы с Lаспарагиновой кислотой для того, чтобы доказать, что pAsp связывается с ферментом и предотвращает неспецифическую амплификацию исключительно за счет его полимерной структуры. Была также проведена амплификация в присутствии гепарина, взятого в качестве контрольного анионного полиэлектролита.

Аспартат натрия в концентрации, эквивалентной мономерам pAsp, не влиял на скорость как специфических, так и неспецифических реакций, тогда как pAsp предотвращал или существенно снижал эффективность неспецифической амплификации (табл. 3.11). Наименьшие значения Tt (20-70 мин) найдены для образцов с CTc (рис. 3.32Б, кривые, отмеченные буквой C); для образцов с LTc значения Tt находились в диапазоне 30-170 мин (рис. 3.32Б, кривые, отмеченные буквой буквой L).



Рис. 3.32. (А) Структура поли(аспарагиновой) кислоты (рАsp, натриевая соль). (Б) Изотермическая амплификация линейных (LTc, кривые отмечены буквой L) и кольцевых (СTc, кривые отмечены буквой C) матриц с полимеразами Bst 2.0 (кривые с точками) и Vent exo- (кривые с крестиками) в буфере Isothermal, без pAsp (сплошные кривые) и в присутствии 0,01% pAspI (штриховые кривые). NTC – отрицательный контроль.

Более высокие Тt наблюдались при амплификации с полимеразой Vent exo- из-за ее более слабой цепь-вытесняющей или полимеразной активности по сравнению с Bst exo-. Для полимеразы Bst 2.0 MM предотвращалась (в случае pAspI и pAspII) или значительно снижалась (в случае pAspIII) при высоких концентрациях полиэлектролита. Для Vent exo-, все pAsp эффективно предотвращали MM при концентрации ≥0.05%, однако увеличивали продолжительность специфической реакции (табл. 3.11). Для низких концентраций pAsp

увеличение составило <2 раз, а для высоких оказалось неприемлемым (до 4 раз). Гепарин ингибировал обе полимеразы и блокировал амплификацию во всех буферах, кроме Таq-ME. Характер изменения активности обеих полимераз в использованных буферах был схожим и не зависел от вида pAsp. Наибольшее ингибирование наблюдалось при использовании буфера Thermopol, что приводило к значительному увеличению времени реакции (>1 ч). Наибольшие скорость амплификации и специфичность достигались для pAspI в буферах Isothermal и Taq-ME.

Таблица 3.11. Влияние добавочного агента на величину порогового времени Tt (мин), найденного для амплификационных образцов с кольцевой (СTc) и линейной (LTc) матрицами.

Побавка	% (U*) Sydy 0 Isotherm 0,01 Isotherm 0,01 Isotherm 0,01 Isotherm 0,01 Isotherm 0,01 Isotherm 0,01 Isotherm 0,05 Isotherm 0,05 Isotherm 0,1 Isotherm 0,01 Isotherm 0,01 Isotherm 0,1 Isotherm 0,01 Isotherm 0,05 Isotherm 0,05 Isotherm 0,1 Isotherm 1aq-ME Taq-ME	Bst 2		2.0	Vent	t exo-
дооавка	/0 (0)	БуферПеттороlIsothermalTaq-ME	СТс	LTc	СТс	LTc
		Thermopol	33±2	47±5	55±2	103±13
-	0	Isothermal	20±1	35±5	40±3	87±8
		Taq-ME	15±1	31±6	37±2	68±12
		Thermopol	42±4	180**	85±4	183±24
	0,01	Isothermal	26±1	164±15	63±2	145±10
		Taq-ME	18±2	127±5	57±1	128±16
		Thermopol	66±2	-	117±5	-
pAspI	pAspI 0,05		50±3	-	98±5	-
		Taq-ME	41±1	174±11	86±4	-
		Thermopol	81±4	-	-	-
	0,1	Isothermal	65±3	-	143±5	-
		Taq-ME	60±3	-	132±4	-
		Thermopol	45±2	87±9	72±2	174**
	0,01	Isothermal	23±2	72±5	52±2	156±21
		Taq-ME	20±1	58±7	48±3	132±13
		Thermopol	58±2	165**	94±3	-
pAspII	0,05	Isothermal	49±3	170±16	71±2	-
		Taq-ME	37±2	119±7	69±3	-
		Thermopol	79±3	-	117±4	-
	0,1	Isothermal	62±2	-	93±5	-
		Taq-ME	55±3	-	87±3	-
		Thermopol	48±4	85**	71±2	-
pAspIII	0,01	Isothermal	21±2	77±6	53±1	167±18
		Taq-ME	20±3	73±7	47±3	152±15

		Thermopol	53±3	112**	89±4	-
	0,05	Isothermal	47±3	98±11	77±3	-
		Taq-ME	40±2	81±6	71±3	-
		Thermopol	74±3	172±11	121±3	-
	0,1	Isothermal	63±4	117±19	102±2	-
		Taq-ME	62±4	94±12	93±2	-
0.0100000		Thermopol	31±3	48±8	58±2	107±7
аспартат	0,1	Isothermal	21±1	34±7	42±2	84±10
натрия		Taq-ME	17±1	29±5	39±1	70±9
	0,01	Thermopol	-	-	-	-
		Isothermal	-	-	-	-
		Taq-ME	154±24	-	124±18	-
гепарин		Thermopol	-	-	-	-
(натриевая	0,05	Isothermal	-	-	-	-
соль)		Taq-ME	-	-	142±37	-
		Thermopol	-	-	-	-
	0,1	Isothermal	-	-	-	-
		Taq-ME	-	-	-	-

* активность (ед. акт./мл) гепарина (натриевая соль).

** получены результаты амплификации только для одного повтора из трех.

Поскольку на эффективность взаимодействия фосфатных групп молекул ДНК и поверхностных аминогрупп полимеразы должна влиять кислотность раствора, была проведена амплификация КМ и ЛМ под действием ДНК-полимеразы Bst 2.0 в присутствии 0,01% pAsp I при различных значениях pH реакционной смеси (рис. 3.32).



Рис. 3.33. Влияние рН на протекание АКК (сплошные кривые) и ММ (пунктирные кривые) (условия амплификации: ДНК-полимераза Bst 2.0, буфер Isothermal). Значения Тt были получены в присутствии 0,01% pAspI (квадраты) и 0,1% Asp (треугольники) или без добавок (кружки).

В случае АКК снижение pH приводило к увеличению значений Tt, что свидетельствовало о снижении полимеразной активности фермента, которая полностью терялась при pH ниже 7,6. В этих же условиях способность к неспецифическому синтезу снижалась быстрее, и MM не протекала уже при pH ниже 8,0. Добавление pAspI приводило к резкому снижению эффективности MM, которая предотвращалась при pH ниже 8.4. Наличие аспартата натрия не сказывалось на активности полимеразы. Таким образом, ингибирование MM в присутствии анионного полиэлектролита стало косвенным подтверждением справедливости предполагаемого механизма данной реакции.

Известно, что дыхание ДНК наиболее интенсивно протекает вблизи температуры плавления/денатурации ДНК [[Frank-Kamenetskii, Prakash, 2014; von Hippel et al., 2013; Beyerle et al., 2021]. Нами было установлено, что наибольшая эффективность ММ для Bst LF достигается при 55-60°С. Эффективность ММ снижалась при t°>60°С, вероятно, из-за более хаотичного движения цепей ДНК и их диссоциации с глобулы фермента, а также изза невозможности отжига 3'-концов и образования *Ini*. Низкая эффективность ММ при t°<55°С, вероятно, обусловлена менее интенсивным дыханием ДНК, а также снижением активности полимеразы. Для оценки влияния термодинамических характеристик ДНКдуплексов на ход ММ были проведены эксперименты с праймерами R51-n1, R51-n2 и R51-n3, имеющими один, два или три некомплементарных ДНК-матрице нуклеотида на 5'-конце, соответственно. Наличие неспаренных нуклеотидов обусловливает частичную денатурацию концов ДНК-дуплекса, не зависящую от денатурации за счет дыхания ДНК. Амплификацию проводили в режиме температурного градиента. В целом, увеличение количества некомплементарных нуклеотидов приводило к постепенному снижению значений Tt (рис. 3.34).



Рис. 3.34. Влияние стабильности ДНК-дуплекса на эффективность ММ (N/A - амплификация не протекает).

Для ДНК-дуплексов с неспаренными нуклеотидами наибольшая эффективность MM достигалась при более низких температурах по сравнению с совершенным. Примечательно, что наименее стабильные ДНК-дуплексы с двумя и тремя некомплементарными нуклеотидами обеспечивали MM при температурах ниже 47°C, тогда как остальные два дуплекса не приводили к MM, вероятно, за счет того, что цепи ДНК в них оказывались гибридизованы и не взаимодействовали с глобулой фермента. Таким образом, менее стабильные ДНК-дуплексы обеспечивают более эффективную MM за счет большей подвижности концевых участков цепей.

Интересным представляется еще одно наблюдение, касающееся протекания ММ для изученных молекулярных систем. При попытке провести ММ с использованием олигонуклеотидного дуплекса в качестве исходной матрицы реакция не протекала. В этом случае брали комплементарные друг другу олигонуклеотиды LTc и LTc comp (табл. 2.6, №№228 и 229), а также праймеры к ним. Предварительно проводили отжиг данных матриц, далее готовили амплификационные образцы по стандартной схеме. Однако наработки каких-либо продуктов амплификации не происходило, несмотря, казалось бы, на наличие необходимой дуплексной структуры. Это свидетельствует о том, что старт ММ происходит сразу после завершения элонгации затравочного праймера, т.е. в тот момент, когда полимераза еще не диссоциирует с дуплекса, и, по-видимому, удерживает на своей поверхности ДНК-цепь.

Было также обнаружено, что эффективность ММ повышается при добавлении в реакционные смеси восстанавливающих агентов, таких как дитиотреитол (ДТТ) и βмеркаптоэтанол (2-МЕ). Кроме того, Bst ехо- из свежевскрытой упаковки обеспечивает максимальную эффективность ММ, а со временем ее способность вести ММ снижается, но при этом полностью сохраняется уровень полимеразной активности. Добавление ДТТ или 2-МЕ в ММ-реакционные смеси приводит к восстановлению неспецифической активности. Подобное поведение фермента можно объяснить димеризацией части молекул за счет образования дисульфидных мостиков. В структуре Bst ехо- имеется два остатка цистеина в положениях 92 и 549 (для сравнения: в структуре ДНК-полимеразы Таq нет ни одного цистеина), расположенные в разных доменах (рис. 3.35). Суя549 находится на поверхности ферментной глобулы вдали от активного центра и доступен для образования дисульфидных мостиков, в то время как доступ к Суя92 затруднен. Таким образом, теоретически за счет Суя549 полимераза Bst ехо- может существовать в форме димера, способного вести синтез ДНК-цепей.

157



Рис. 3.35. Пространственная структура ДНК-полимеразы Bst exo- (PDB: 1LV5). Голубым и жёлтым цветами выделены домены, в которых расположены остатки цистеина, зелёным (дополнительно отмечены красными стрелками) – остатки цистеина, оранжевым – ДНК.

Влияние ДТТ и 2-МЕ на протекание ММ оценивали следующим образом. Предварительно готовили "состаренный" образец полимеразы Bst LF, для чего фермент помещали в микроцентрифужную пробирку на 0,6 мл и далее в течение 10 рабочих дней выдерживали пробирку в открытом состоянии в морозильнике (-20°С) три раза по 10 мин каждый день. Затем данный препарат смешивали с восстанавливающими агентами с таким расчетом, чтобы их конечные концентрации в амплификационных образцах составили: для ДТТ – 1, 5, 10 или 30 мМ, для 2-МЕ – 2, 10 или 20 мМ. Эти смеси выдерживали в течение 0, 0,5, 1, 2 и 4 ч, далее их использовали для приготовления амплификационных образцов (ставили параллельно ММ и АКК с матрицами LTc и CTc, соответственно).

Для образца "состаренной" полимеразы Bst LF MM протекала с низкой эффективностью: значения Tt составили 98±24 мин (табл. 3.12). При этом значения Tt для AKK-образцов (с кольцевой матрицей) составили 36±4 мин, что свидельствует о сохранении полимеразной активности фермента. С наибольшей эффективностью MM протекала в образцах, содержавших 5-10 мM ДTT или 2 мМ 2-МЕ. Минимальное значение Tt найдено для MM-образцов, полученных при добавлении полимеразы, выдержанной в присутствии 5 мM ДTT или 2 мM 2-ME в течение 1 ч. Высокие концентрации восстанавливающих агентов приводили к высоким значениям Tt или невозможности протекания амплификации, что связано, возможно, с ингибированием полимеразной активности Bst LF. Таким образом, повышение эффективности MM в присутствии ДTT и 2-ME может косвенно свидетельствовать об участии остатков цистеина в снижении способности полимеразы Bst LF вести MM за счет димеризации фермента.

Таблица 3.12. Влияние дитиотреитола (ДТТ) и β-меркаптоэтанола (2-МЕ) на эффективность амплификации линейной (LTc) и кольцевой (СTc) матриц (использовали препарат искусственно "состаренной" ДНК-полимеразы Bst LF; брали 10⁷ копий ДНК-матриц).

	Kouueutrouug		Среднее пороговое время Tt			
Добавка	концентрация,	продожительность	(м	ин)		
	MIVI	экспозиции	LTc	СТс		
-	-	-	98±24	36±4		
		0	91±14	36±2		
		0,5	83±19	35±2		
	1	1	66±7	35±2		
		2	58±5	31±1		
		4	60±11	32±2		
		0	84±17	29±3		
		0,5	51±12	26±1		
	5	1	38±3	27±1		
		2	40±5	27±2		
ЛТТ		4	46±7	28±2		
<u>д</u> 11		0	63±9	27±1		
		0,5	45±6	27±2		
	10	1	39±5	29±2		
		2	47±10	28±1		
		4	59±8	28±1		
		0	96±25	44±9		
		0,5	138±19	48±3		
	30	1	124±37	46±5		
		2	-	-		
		4	-	-		
		0	68±11	35±1		
		0,5	54±13	35±1		
	2	1	42±10	33±1		
		2	43±7	34±1		
		4	47±10	33±1		
		0	60±6	33±1		
		0,5	61±8	30±1		
2-ME	10	1	63±12	30±1		
		2	81±16	31±2		
		4	93±20	32±1		
		0	57±15	34±2		
		0,5	89±19	34±2		
	20	1	-	38±1		
		2	-	-		
		4	-	-		

Для прямого доказательства механизма ММ были проведены два эксперимента. В первом ММ проводили, добавляя в реакционные образцы сразу две линейные матрицы – LT51 и LTc, отличающиеся нуклеотидной последовательностью, и соответствующие праймеры к ним. В случае, если *Ini* образуется исключительно за счет изгиба исходной ДНК-матрицы и отжига ее 3'-конца на противоположной цепи дуплекса, в ходе ММ должны образоваться мультимерные продукты, содержащие последовательность только одной матрицы (рис. 3.36, путь 1). Если образование *Ini* происходит за счет отжига на противоположной цепи дуплекса 3'-конца любой подходящей линейной ДНК (рис. 3.36, путь 2), то в ходе ММ должны образоваться мультимерные образоваться мультимеры, полученные для смеси LT51 и LTc, содержат нуклеотидную последовательность только одной из матриц, что свидетельствует о протекании реакции исключительно по первому пути (рис. 3.38A).



Рис. 3.36. Схема протекания мультимеризации в присутствии двух разных линейных матриц (пояснения в тексте).

Во втором эксперименте ММ проводили, добавляя в реакционные смеси линейную матрицу LTc и праймеры Fc mism/Rc mism, имеющих по центру цепи один некомплементарный матрице нуклеотид (обозначен как N на рис. 3.37). В случае, если *Ini* образуется за счет изгиба исходной ДНК-матрицы и отжига ее 3'-конца на противоположной цепи, в последовательности мультимерных продуктов должны появиться нуклеотиды, заложенные в структуре праймеров или комплементарные им. При этом характер распределения таких нуклеотидов будет зависеть от того, с какой стороны дуплекса происходит старт ММ. Так, при старте со стороны праймера Rc mism крайний олигонуклеотидный повтор в мультимере будет содержать нуклеотид N' исходной матрицы, а в остальных повторах будут находиться N_C, комплементарные нуклеотиду N из праймера. В случае старта со стороны праймера F набор продуктов более разнообразен. Таким образом, положение измененных олигонуклеотидных повторов определяется стартовой матрицей.



Рис. 3.37. Схема протекания мультимеризации с использованием праймеров, имеющих по центру цепи один некомплементарный матрице нуклеотид (приведена схема старта MM со стороны праймера R, детальные пояснения в тексте).

Секвенирование мультимеров, полученных для данной молекулярной модели, подтвердило справедливость предложенного механизма ММ. Так, в структуре продуктов, полученных со стороны праймера R, в крайнем ("начальном") повторе находился нуклеотид, соответствующий таковому из последовательности данного праймера, а в остальных – индуцированный праймером (рис. 3.38Б).

(A)



Рис. 3.38. Мультимеризация в присутствии альтернативных компонентов реакции: А) примеры первичной структуры мультимеров, полученных после реакции MM со смесью LT51 и LTc; Б) пример первичной структуры мультимеров, полученных с праймером R51c-mism (пояснения в тексте).

В целом, стоит отметить, что в большинстве мультимерных продуктов каждый олигонуклеотидный тандемный повтор содержал, как правило, делеции одинакового размера, располагавшиеся по одну сторону. Такое расположение делеций прямо указывает на сокращение длины последовательности за счет изгиба цепей ДНК-матрицы и отжига ее З'-концов на противоположной цепи дуплекса. Таким образом, представленные результаты свидетельствуют в пользу образования псевдоциклической ДНК, запускающей ММ.

3.4.3. Способы предотвращения мультимеризации

Поскольку ММ протекает через образование *Ini*, ингибирование данной нежелатальной реакции возможно путем предотвращения его формирования или инактивации. Одним из способов ингибирования ММ является использование праймеров, несущих химические модификации, которые препятствуют продвижению ДНК-полимеразы вдоль цепей ДНК. В качестве таковых были взяты праймеры с фосфорилгуанидиновыми группами (ФГ), предоставленные коллегами из ИХБФМ СО РАН (рис. 3.39А). В качестве амплифицируемой ДНК выступали линейная матрица LTc (табл. 2.6, № 240) и ее кольцевая форма CTc.



Рис. 3.39. Структура праймеров, использованных для предотвращения мультимеризации: (А) модифицированный межнуклеозидный фосфат, несущий 1,3-диметил-2-иминоимидазолидиновые фрагменты (группа PG) в сахарофосфатном остове; (Б) расположение модификаций (темные кружки) в соответствующих парах праймеров.

Влияние ФГ-модификаций на способность полимеразы Bst ехо- вести синтез ДНКцепей было нам неизвестно, поэтому синтезировали несколько пар праймеров с одним, двумя или тремя модифицированными межнуклеозидными фосфатами вблизи 3'- и 5'концов и по центру цепи (рис. 3.39Б). Для всех вариантов расположения ФГ теортически можно было бы ожидать ингибирования ММ (схематично представлено на рисунке 3.40). Однако ФГ-модификации вблизи 5'-конца праймеров не влияли на эффективность амплификации как линейной, так и кольцевой матрицы (табл. 3.13).



Рис. 3.40. Механизм блокировки мультимеризации: отжиг и удлинение R-праймера, приводящие к образованию единственного (1L) двухцепочечного продукта (этап 1), образование циклоподобной вторичной структуры (этап 2) и начало элонгации (этап 3), блокирование мультимеризации, когда группы PG останавливают движение полимеразы (этап 4b) или нормальную элонгацию, когда группы PG не препятствуют движению полимеразы (этап 4a), удлинение верхней цепи или отжиг R-праймера (этап 5), образование полного ампликона с дублированной нуклеотидной последовательностью (этапы) ба, бб и 7б), замещение цепи III и отжиг праймера F (этап 7a), формирование полных ампликонов с множественными (тандемными) нуклеотидными повторами (этапы i). Последовательности праймера F и комплементарных сайтов показаны черным, последовательности праймера R и комплементарных сайтов показаны серым. Символы звездочек на цепях ДНК схематически обозначают положение последовательных групп PG (около 3'-конца, в середине и вблизи 5'-конца F- или R-праймеров).

Одна ФГ-группа рядом с 3'-концом праймера незначительно затрудняла протекание амплификации, тогда как две группы существенно затрудняли амплификацию, а три – полностью ее 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.

Таблица 3.13. Эффективность изотермической амплификации линейной (LTc) и кольцевой (CTc) матриц с ФГ-модифицированными праймерами (10⁷ копий ДНК-матриц, ДНК-полимераза Bst 2.0).

	среднее поре	оговое время		среднее пороговое время			
Праймерная	(мі	ин)	Праймерная	(м	ин)		
пара	матрица	матрица	пара	матрица	матрица		
	LTc	СТс		LTc	СТс		
Fc/Rc	53,4±5,9	15,2±1,5	Fc5/Rc5	50,8±9,6	13,9±1,6		
Fc1/Rc1	67,8±5,3	27,4±2,1	Fc6/Rc6	-	-		
Fc2/Rc2	50,6±7,1	13,5±1,4	Fc7/Rc7**	-	11,6±1,5		
Fc3/Rc3	53,2±6,8	15,7±1,8	Fc8/Rc8	47,2±6,3	13,5±2,0		
Fc4/Rc4	110,3±14,7	60,4±1,7	Fc9/Rc9	60,2±5,6	11,2±1,3		
Fc/Rc1	43,5±7,4	17,3±1,8	Fc1/Rc	Fc1/Rc 50,7±4,4			
Fc/Rc4*	-	60,5±2,2	Fc4/Rc	-	50,6±1,5		
Fc/Rc5	67,8±8,6	47,5±1,7	Fc5/Rc	63,5±7,8	13,2±1,9		
Fc/Rc6	-	-	Fc6/Rc	-	-		
Fc/Rc7	63,4±5,3	53,4±1,4	Fc7/Rc	77,1±11,3	53,6±1,4		
Fc1/Rc4	-	36,6±1,6	Fc4/Rc1	-	33,5±1,6		
Fc1/Rc5	63,7±5,5	27,2±1,4	Fc5/Rc1	67,6±10,5	17,7±1,5		
Fc1/Rc6	-	-	Fc6/Rc1	-	-		
Fc1/Rc7	77,3±8,2	60,4±1,9	Fc7/Rc1	74,8±7,3	53,5±2,0		
Fc4/Rc5	74,5±5,1	33,6±1,8	Fc5/Rc4	-	27,4±1,5		
Fc4/Rc7	63,3±4,8	50,5±1,1	Fc7/Rc4	-	60,2±2,1		
Fc6/Rc7	-	-	Fc7/Rc6	-	-		

* жирным шрифтом выделены сочетания праймеров, обеспечивающие ингибирование MM и протекание AKK.

** серой заливкой выделено сочетание праймеров, обеспечивающее наибольшую эффективность АКК.

Еще одним способом ингибирования ММ может служить использование праймеров и матриц, несущих объемные группы по 3'- и 5'-концам, которые потенциально могут стабилизировать концы дуплекса, препятствуя "дыханию" цепей или вызывать стерические затруднения в работе полимеразы. Была синтезирована матрица LTk и праймеры Fk и Rk, в которых по 5'-концам располагалась диметокситритильная группа DMT, а по 3'-концу LTk – флуоресцентный краситель FAM. Оба фрагмента имеют относительно большой размер, устойчивы к отщеплению в условиях ферментативных превращений, а синтез ОДH с такими группами является рутинным. В качестве контроля использовали немодифицированные варианты указанных матрицы и праймеров (набор LTm, Fm и Rm, табл. 2.6, №№283-286). Амплификацию с перечисленными матрицами и праймерами проводили в различных их сочетаниях. Оказалось, что введение объемных групп в праймеры несколько затрудняет MM, но не предотвращает ее; значимого снижения эффективности MM не наблюдалось (табл. 3.14, столбцы 1 и 2).

Таблица 3.14. Среднее значение порогового времени Тt (мин) при изотермической амплификации линейных и кольцевых матриц праймерами с объемными группами.

Матрица	Молекулярная система								
	LTm/Fm/Rm	LTk/Fk/Rk	LTm/Fk/Rk	LTk/Fm/Rm					
линейная	46,4±11,2	74,3±19,4	51,7±13,8	47,8±9,4					
кольцевая	17,3±2,1	-	16,8±1,4	-					

3.4.4. Предпочтительность связывания Bst exo- с ДНК

При изучении мультимеризации (ММ), протекающей под действием ДНКполимеразы Bst exo-, нами было обнаружено различие во времени начала ЭСР, которая соответствует началу накопления детектируемого количества продуктов, при использовании в качестве ДНК-матриц олигонуклеотидов одинаковой длины (около 50 нт), но разного нуклеотидного состава. На примере реакции EXPAR зарубежными авторами было показано, что величина порогового времени для образцов отрицательного контроля, в которых протекал неспецифический ДНК-синтез, также зависит от первичной структуры используемых ДНК-матриц [Qian et al., 2012]. Вероятно, сила взаимодействия (прочность связывания) полимеразы Bst exo- с теми или иными нуклеотидами для матриц с разным составом варьирует настолько, что может обусловливать заметное различие в скорости образования и/или стабильности соответствующих фермент-субстратных комплексов, инициирующих запуск неспецифического ДНК-синтеза. Таким образом, изотермическая амплификация в этом случае будет контекстно-зависимой.

Для проверки справедливости данного предположения изучали комплексы полимеразы Bst ехо- с ДНК с помощью молекулярного докинга и оценивали эффективность запуска MM для матриц с различающимся нуклеотидным составом концевых мотивов. Молекулярный докинг проводили для трех конформационных форм Bst ехо-: "открытой" (PDB: 1L3S), "полуоткрытой" (2HVI) и "закрытой" (1LV5). "Открытая" форма фермента соответствует состоянию связывания полимеразы с двуцепочечной ДНК, "полуоткрытая" – оптимизации конформации активного центра перед присоединением нуклеотида, "закрытая" – каталитического события, т.е. в момент присоединения конкретного нуклеотида к растущей цепи [Wu, Beese, 2011]. Для проведения *in silico* исследований использовали программный пакет Schrodinger Suite 2016-4, который позволяет вести расчеты для замороженных состояний молекул. Поскольку целью данной части работы было определение параметров связывания полимеразы с ДНК, а не сайта связывания, расчеты проводились с сохранением исходной конформации молекулы фермента.

Докинг проводили в трехнуклеотидном приближении для комплексов полимеразы с ДНК, в качестве которых выступали все возможные 64 варианта одноцепочечных тринуклеотидов (далее обозначены как sst) и 64 варианта динуклеотидных дуплексов с одним "свисающим" 5'-концевым нуклеотидом (далее dst, двуцепочечный тринуклеотид) (рис. 3.41).

sst 5'-сн₃оро₃-N1-N2-N3-он-з'

<u>dst</u> 5'-сн₃оро₃-**N1'-N2'**-он-з' з'-но-**N3 -N2 -N1**-оро₃сн₃-5'

Рис. 3.41. Структура модельных одноцепочечных (sst) и двуцепочечных (dst) тринуклеотидов.

В указанных ДНК-структурах атомы водорода 5'-фосфатных групп были замещены на метильные группы для исключения влияния подвижных (кислых) протонов на результаты докинга. Структуры sst имитировали молекулярный комплекс при гипотетически возможном неспецифическом связывании фермента с одноцепочечной ДНК в активном центре; sst моделировали и далее анализировали с целью их сравнения с dst – ДНК-фрагментами в реальных фермент-субстратных комплексах в момент

167

присоединения нуклеотида. Для sst пространственную ориентацию тринуклеотида задавали аналогично таковой для dst.

Расчеты проводили для всех возможных вариантов фермент-субстратных комплексов, образованных тремя формами Bst ехо- и модельных ДНК (384 варианта). Они позволили получить значения параметров glide emodel, potential energy и docking score, характеризующих прочность соответствующих молекулярных структур. Величина docking score является интегральной и наиболее точно отображает стабильность комплексов в целом; в случае образования устойчивого комплекса этот показатель имеет отрицательные значения. Для всех 384 структур были получены отрицательные значения docking score. В случае sst величина docking score принимает 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 (Приложение, табл. П2). Бо́льший диапазон значений в случае dst объясняется, по всей видимости, меньшим числом возможных для таких ДНК-структур степеней свободы ввиду их двуцепочечного строения, что приводит к снижению количества доступных конформационных состояний, в которых может реализоваться большее число химических взаимодействий в пределах комплекса. 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 (Приложение, табл. ПЗ). Более прочными оказались комплексы, содержащие в ДНК-структурах пиримидиновые нуклеотиды: dC и dT в положениях N2 и N3 для sst, и dC в положении N2 для dst (рис. 3.42).



Рис. 3.42. Усредненные значения *docking score*, полученные для комплексов Bst exo- с модельными ДНК при рассмотрении только нуклеотидов N2 и N3 (звездочкой отмечены динуклеотиды, соответствующие наиболее прочным комплексам).

По-видимому, на прочность связывания ДНК с ферментом оказывает влияние гидрофобность азотистых оснований, которая максимальна у цитозина и минимальна у аденина [Knorre et al., 1988; Kolocheva et al., 1991]. Ранее уже было показано влияние структуры и состава полинуклеотидов на эффективность синтеза ДНК *in vitro* [Doronin et al., 1989; Kolocheva et al., 1989], однако проявление данного феномена в контексте протекания ММ требует дальнейшего более детального изучения.

Наиболее ярко зависимость взаимодействия фермента с ДНК от нуклеотидного контекста выражена для "закрытой" формы полимеразы 1LV5 с двуцепочечными тринуклеотидами. Согласно расчетам, для данных комплексов получен наибольший разброс между минимальным и максимальным значениями *docking score* (табл. 3.15). Среди 16 структур, содержащих dC в положении N2, 10 структур характеризуются минимальной *benuчuhoй docking score* в своих группах (четверках тринуклеотидов dst). Такое строение соответствует наличию dG на 3'-конце противоположной цепи, что свидетельствует о предпочтительности связывания Bst exo- с dG-богатыми ДНК.

Природа химических взаимодействий, стабилизирующих комплексы, была определена на основании диаграмм взаимодействия лигандов (ДВЛ) – 2D-изображений, на которых аминокислоты (а/к) представлены в виде сфер, окрашенных в соответствии с их химическими свойствами (рис. 3.43).



Рис. 3.43. Диаграмма взаимодействия лигандов на примере комплекса Bst exo- c dst (в качестве примера приведен тринуклеотид 5'-CAC-3'). В виде сфер представлены а/к: фиолетовые сферы – а/к, несущие положительно заряженные группы, голубые – содержащие полярные группы, зеленые – гидрофобные, красные – несущие отрицательно заряженные группы; цветными линиями и стрелками показаны химические взаимодействия между а/к и окружением: красные стрелки – ионные связи (солевые мостики, sb), синие – водородные связи (H), отсутствие стрелок – прочие слабые взаимодействия (+).

		нуклеотид N1								
нуклеотид N3	нуклеотид N2	d	A	d	С	d	G	ď	Г	
113	112	sst	dst	sst	dst	sst	dst	sst	dst	
	dA	-7,176	-4,592	-7,524	-6,289	-7,162	-8,920	-7,292	-7,423	
dA	dC	-7,204	-9,459**	-7,445	-9,911	-7,161	-9,361	-8,170	-9,219	
uri	dG	-7,251*	-6,117	-7,605	-5,776	-8,480	-10,329	-7,643	-5,280	
	dT	-7,169	-3,223	-8,353	-6,137	-7,870	-4,545	-7,699	-1,626	
	dA	-6,989	-6,114	-7,022	-3,971	-6,179	-6,095	-6,982	-7,335	
dC	dC	-10,743	-9,838	-9,536	-10,034	-7,015	-10,022	-9,811	-10,043	
ue	dG	-7,468	-9,298	-6,925	-9,571	-6,914	-10,119	-7,193	-5,506	
	dT	-8,371	-10,969	-10,610	-6,381	-7,179	-6,600	-9,509	-4,097	
	dA	-7,606	-7,354	-7,865	-6,139	-7,212	-6,759	-6,868	-4,806	
dG	dC	-6,640	-9,926	-7,362	-4,841	-7,874	-9,628	-7,709	-4,541	
ů	dG	-8,001	-5,318	-7,886	-7,772	-7,203	-8,030	-7,920	-6,616	
	dT	-7,409	-6,771	-6,890	-6,879	-7,354	-7,786	-7,679	-4,856	
	dA	-7,196	-6,585	-7,309	-5,102	-6,875	-8,494	-6,844	-3,993	
dT	dC	-10,502	-9,848	-9,321	-3,713	-7,616	-10,628	-9,911	-10,399	
	dG	-7,104	-6,306	-7,073	-3,752	-6,946	-3,774	-8,562	-3,832	
	dT	-11,485	-4,870	-8,670	-3,092	-7,744	-9,705	-11,067	-8,361	
минимальное	значение (MIN)	-11,485	-10,969	-10,610	-10,034	-8,480	-10,628	-11,067	-10,399	
максимальное	значение (МАХ)	-6,640	-3,223	-6,890	-3,092	-6,179	-3,774	-6,844	-1,626	

Таблица 3.15. Значения *docking score*, найденные для комплексов Bst exo- (форма 1LV5) с модельными ДНК.

Δ (MAX-MIN)	4,845	7,746	3,720	6,942	2,301	6,854	4,223	8,773
среднее значение	-8,020	-7,287	-7,962	-6,210	-7,299	-8,175	-8,179	-6,121
стандартное отклонение	1,500	2,314	1,073	2,204	0,530	2,096	1,256	2,486

* жирным шрифтом выделены максимальные в группе (в четверках соответствующих тринуклеотидов с переменным N2) значения docking score.

** серой заливкой выделены ячейки, соответствующие максимальному значению *docking score* для структур, содержащих dC в положении N2.

Таблица 3.16. Тип и количество химических связей в комплексах Bst exo- (форма 1LV5) с dst (приведены данные для 10 комплексов с наибольшим и 10 комплексов с наименьшим значением *docking score*).

	dst, <i>docking</i>		Тип и количество химических				Индекс	Количество			
NºNº	3'→5'	score		СВЯ	зей		связывания R	ŀ	іуклес	тидон	3
	0 0	50010	sb1*	sb2**	H**	(+)**		dA	dG	dC	dT
1	СТА	-10,97	1	2	7	25	35	1		1	1
2	TCG	-10,63	2	2	8	24	36		1	1	1
3	TCT	-10,40	2	4	6	20	32			1	2
4	AGG	-10,33	2	4	8	20	34	1	2		
5	CGG	-10,12	1	3	7	21	32		2	1	
6	CCT	-10,04	2	3	7	23	35			2	1
7	CCC	-10,03	1	3	7	23	34			3	
8	CCG	-10,02	1	3	9	22	35		1	2	
9	GCA	-9,926	1	2	5	23	31	1	1	1	
10	ACC	-9,911	2	2	7	22	33	1		2	
								4	7	14	5
55	CTT	-4,097	1	3	2	20	26			1	2
56	TAT	-3,993		3	3	18	24	1			2
57	CAC	-3,971		3	3	19	25	1		2	
58	TGT	-3,832	1	3	2	22	28		1		2

								5	4	7	14
64	ATT	-1,626	1	2	3	21	27	1			2
63	TTC	-3,092	1	3	5	17	26			1	2
62	ATA	-3,223	1	2	5	14	22	2			1
61	TCC	-3,713	1	3	1	17	22			2	1
60	TGC	-3,752	1	3	2	21	27		1	1	1
59	TGG	-3,774	1	2	2	21	26		2		1

* sb1 – ионные связи между катионом металла (Mn²⁺) и ДНК.

** химические связи между ДНК и аминокислотами: sb2 – ионные связи, Н – водородные связи, (+) – слабые взаимодействия.

ДВЛ не отображают расстояния между взаимодействующими группами или атомами и показывают только связи в комплексе между лигандом и рецептором. Оказалось, что Bst exo- связывается с модельными ДНК посредством ионных (sb) и водородных (H) связей и слабых взаимодействий (+). Для всех изученных комплексов ДВЛ позволили определить точки взаимодействия полимеразы с ДНК (данные для 10 наименее стабильных и 10 наиболее стабильных комплексов полимеразы с dst приведены в таблице 3.16).

аминокислот, образующих связи какого-либо B целом, количество ИЗ перечисленных типов, достигает нескольких десятков. Максимальное число ионных связей составило 6 в комплексе Bst exo- с 5'-TAA-3', однако данная структура по величине docking score не входит в группу 10 наиболее стабильных. На основании данных о количестве взаимодействий были определены индексы связывания R по формуле: R = sb + H + (+). R является интегральным показателем, характеризующим стабильность комплексов в целом. Оказалось, что для 10 наименее прочных комплексов Bst exo- c dst значения R не превышали 30 единиц, в то время как для 10 наиболее прочных они были выше этой величины (табл. 3.16). В наименее прочных структурах повышено содержание нуклеотида dT, а в наиболее прочных – dC в нижней трехнуклеотидной цепи. При этом в dst первой из указанных групп в среднем положении триплета заметно чаще находятся dT (4 варианта из 10) и dG (3 варианта), в dst второй группы – dC (7 вариантов). 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. Таким образом, согласно проведенному анализу химических взаимодействий, прочность связывания Bst exo- с ДНК зависит от вида нуклеотидов и для пурин-богатых последовательностей обеспечивает более эффективный запуск реакций побочного ДНК-синтеза. По-видимому, для исключения протекания неспецифической амплификации следует избегать ДНК-структур, содержащих концевые нуклеотиды dA и/или dG.

Результаты *in silico* исследований свидетельствуют о несколько бо́льшей прочности связывания Bst exo- с пурин-богатыми ДНК-последовательностями. Предпочтительность связывания фермента с ДНК не проявляется, по-видимому, в заметной степени при запуске обычных реакций амплификации и непосредственно в ходе синтеза ДНК, протекание которых четко детерминировано образованием матрицей и праймерами значительного количества прочных вторичных структур. Однако в случае ММ запуск реакции является событием, характеризующимся малой математической вероятностью, поскольку зависит от факторов, влияющих на образование триггерной молекулярной

175

структуры (Ini). Этап 2 (схема на рис. 3.30) лимитирует протекание MM, поскольку формирование *Ini* – маловероятное событие. При определенных **VCЛОВИЯХ**. обеспечивающих "подвижность" концевых участков цепей ДНК и большую стабильность Ini, возможно смещение равновесия в сторону его образования. Одним из таких условий может служить, предположительно, более прочное связывание полимеразы с 3'-ДНК. концевыми нуклеотидами цепей Экспериментальную оценку данного предположения проводили с использованием шести линейных олигонуклеотидных матриц длиной 51 нт, различающихся составом 3'- и 5'-концевых мотивов и имеющих практически идентичную внутреннюю последовательность (табл. 3.17 или в табл. 2.2, №№232, 236, 265, 269, 273, 277).

Таблица 3.17. Олигонуклеотидные ДНК-матрицы, использованные для оценки сиквенсспецифичности ММ (*).

Шифр	Последовательность, 5'→3'				
LTa	GTCACGTCAGTCCTGTAGTGCTCAGTGTCGTCGTACAGCCTACATTGCAGA				
LTb	CTCTCTCTCGCTGACGTGCTCAGTGTCGTCGTACAGCCTAAGGAGAAGA				
LTd	AGGAGAAGACTG <u>CTG</u> AC <u>GTGCTCAGTGTCGTCGTACAGCCTA</u> CTCTTCCTC				
LTf	CTGCCGCGACTG <u>CTG</u> AC <u>GTGCTCAGTGTCGTCGTACAGCCTA</u> CTATTATTA				
LTe	ATTATTATACTG <u>CTG</u> AC <u>GTGCTCAGTGTCGTCGTACAGCCTA</u> CGCGGCCGC				
LTg	CAGACGTCAGTCCTGTAGTGCTCAGTGTCGTCGTACAGCCTACATTGCAGA				

* Подчеркиванием отмечена последовательность, общая для всех матриц, курсивом выделена последовательность, общая для матриц LTb, LTd-LTg.

Матрицы конструировали таким образом, чтобы исключить образование ими гомои гетеродимерных структур, способных к элонгации и ММ в отсутствие праймеров. LTa состояла из случайным образом перемежающихся пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов. Матрица LTb содержала на 5'-конце пиримидиновые, а на 3'-конце – пуриновые олигонуклеотидные фрагменты длиной 11 и 10 нт соответственно. В LTd расположение данных фрагментов было противоположным. LTf и LTe имели dA/dT- или dG/dC-богатые концы, а LTg содержала идентичные 4-хнуклеотидные мотивы на 5'- и 3'концах. Такая структура обеспечивает максимальную стабильность *Ini* за счет комплементарности 3'-концов цепей и, как следствие, повышение вероятности запуска MM, что было использовано нами далее при разработке методов обнаружения микроPHK и вирусной PHK. Стоит отметить, что пурин-пиримидиновый состав варьировали не только для 3'-, но и для 5'-конца матриц, поскольку при элонгации праймера R образуется комплементарная цепь, с которой также возможен запуск MM.

Изотермическую амплификацию вели в условиях, способствующих эффективной инициации MM (60°С, пониженная концентрация SGI, реакционный буфер с 2-ME), для обеспечения ее гарантированного протекания для всех матриц и более точной оценки влияния на нее их нуклеотидного состава. Следует отметить, что MM, будучи реакцией неспецифической амплификации, характеризуется значительными величинами Tt (примерно 30-60 мин для "оптимальных" матриц). В целом, было обнаружено влияние состава 3'-концов ДНК-матриц на величину Tt (рис. 3.44), позволившее расположить их в следующем порядке: LTg > LTb >> LTa > LTd >> LTf.



Рис. 3.44. Накопление продуктов мультимеризации для матриц с различающейся первичной структурой концевых фрагментов (приведены данные, полученные при использовании буфера Taq). Вставка: электрофоретическое разделение мультимеров: 1 – матрица LTa, 2 – LTb, 3 – LTd, 4 – LTf, 5 – LTe, 6 – LTg, M – маркер 50 bp DNA ladder.

Гель-электрофоретический анализ подтвердил образование характерных мультимерных продуктов (рис. 3.44, вставка). Матрица LTa, имеющая случайный нуклеотидный состав, показала умеренную склонность к MM. Наибольшую скорость запуска MM (наименьшее значение Tt) обеспечила LTg, содержащая идентичные мотивы по концам цепи. Чуть менее эффективно реакция инициируется для LTb, несущей олигопуриновую 3'-концевую и олигопиримидиновую 5'-концевую последовательности. В то же время матрица LTd, в которой данные типы фрагментов расположены в обратном порядке, продемонстрировала значительно меньшую склонность к запуску MM. Показательно, что наименьшие значения Tt обеспечили LTa, LTb и LTg, содержащие

пуриновые нуклеотиды на 3'-конце. 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.

Для матрицы LTe, имеющей на 3'-конце только нуклеотиды dC и dG (обеспечивают высокую температуру отжига концевого участка), а на 5'-конце - только dA и dT (низкая температура отжига), MM не протекала, что связано, очевидно, с низкой эффективностью денатурации ("дыхания") GC-богатого конца дуплекса. При обратном порядке расположения этих фрагментов (LTf) запуск MM все же происходил, но спустя значительное время после начала реакции.

Состав буферной системы влиял на скорость инициации MM. Тестировали три буфера: Thermopol (рекомендован для Bst LF), Isothermal (для Bst 2.0) и буфер Taq-ME к ДНК-полимеразе Taq ("СибЭнзим"). При равенстве значений pH, концентрации ионов Mg²⁺ и детергентов, указанные буферы содержат разное количество KCl (10, 50 и 25 мM соответственно), а буфер Taq – дополнительно β-меркаптоэтанол. Наименьшие значения Tt найдены для образцов, содержавших буфер для ДНК-полимеразы Taq (табл. 3.18). Вероятно, наличие восстанавливающего агента (β-меркаптоэтанол) обусловило повышение активности ДНК-полимеразы.

Таблица 3.18. Зависимость скорости запуска ММ (в значениях порогового времени Тt, мин) от состава буферной системы.

	Т _{отж.,} °С*	Среднее пороговое время		
ДНК- матрица		буфер Thermopol:	буфер Isothermal:	буфер Таq-МЕ:
		20 мM Tris-HCl	20 мM Tris-HCl	60 мM Tris-HCl
		(рН 8,8), 10 мМ	(рН 8,8), 10 мМ	(рН 8,8), 25 мМ
		(NH ₄) ₂ SO ₄ , 10 мМ	(NH4)2SO4, 50 мМ	KCl, 2 мМ MgCl ₂ ,
		KCl, 2 мМ	KCl, 2 мМ MgSO ₄ ,	10 мМ β-
		MgSO ₄ , 0,1%	0,1% Tween 20	меркаптоэтанол,
		Triton X-100		0,1% Triton X-100
LTa	27,3/22,3	>160	139±41	120±11
LTb	20,3/19,8	147±38	113±42	75±8
LTd	19,8/21,3	-	>160	134±24
LTf	40,1/0,7	-	-	>160
LTe	0,0/50,4	-	-	-
LTg	26,6/22,3	84±15	75±23	53±6

* Т_{отж.} – температура отжига 5'-/3'-концевых мотивов (выделены жирным шрифтом), найдена с помощью OligoAnalyzer.

Интересными представляются результаты, полученные для ДНК-матриц в парах LTb/LTd и LTf/LTe, имеющих зеркальный порядок расположения концевых мотивов. При равной длине и схожих термодинамических характеристиках образующихся на их основе дцДНК, найденные для них значения Tt свидетельствуют о неравнозначности концов первичного дуплекса с точки зрения запуска MM. Различия в величинах Tt указывают на то, что инициация MM для использованной молекулярной системы происходит преимущественно со стороны отжига затравочного (R) праймера. По-видимому, после элонгации праймера R и достраивания второй цепи полимераза, не успевая диссоциировать с первичного дуплекса, задерживается на его конце и далее участвует в формировании *Ini*. Таким образом, хотя "дыхание" цепей ДНК оказывает некоторое влияние на скорость генерации *Ini*, однако в случае сравнимых термодинамических характеристик двуцепочечных структур оно не является определяющим.

3.4.5. Влияние кофактора на активность полимеразы Bst exo-

Поскольку активность ДНК-полимераз зависит от природы кофактора, мы предположили, что замена Mg²⁺ другим катионом сможет обеспечить подавление MM. Ранее было показано, что Mn²⁺, Cd²⁺ и Co²⁺ могут выступать как альтернативные кофакторы полимеразы Bst в реакции удлинения праймера на короткой ДНК-матрице [Vashishtha, Konigsberg, 2018]. Нами было исследовано влияние катионов Ca²⁺, Cd²⁺, Co²⁺. Cu^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} и Zn^{2+} на протекание MM под действием ДНК-полимеразы Bst exo⁻. Так как эффективность ММ зависит от разновидности (формы) данной полимеразы и буфера, эксперименты проводили для трех коммерческих продуктов: Bst LF, Bst 2.0 и Bst 3.0. Вместо буферов, поставляемых вместе с полимеразами, были приготовлены пять составов: Thermopol-C, Isothermal-C, Isothermal II-C, Таq-С и Таq-ME-C, полностью идентичных коммерческим, но не содержащих Mg²⁺. Соответствующие соли металлов добавляли в реакционные смеси отдельно, обеспечивая стандартную концентрацию катионов (2,5 мМ). В качестве примера на рисунке 3.45 приведены результаты амплификации матриц LTc и CTc под действием полимеразы Bst 3.0 в буфере Taq-ME-C, для которого АКК и MM протекали в присутствии пяти катионов: Ca^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} и Mn^{2+} .



Рис. 3.45. Результаты амплификации кольцевой СТс (А) и линейной LTc (Б) матриц под действием Bst 3.0 в буфере Taq-ME-C: кривая $1 - Mg^{2+}$, $2 - Mn^{2+}$, $3 - Cd^{2+}$, $4 - Cu^{2+}$, $5 - Ca^{2+}$, $6-8 - Ni^{2+}$, Zn^{2+} и Co²⁺. Электрофоретический анализ образцов после амплификации кольцевой (В) и линейной (Г) матриц (10% ПААГ), M - 50 bp DNA ladder.

В большинстве случаев рост флуоресценцентного сигнала для образцов с КМ происходил на начальных этапах реакции (относительно небольшие значения Tt); для образов с ЛМ значения Tt были значительно больше (рис. 3.45А и 3.45Б). Эффект, оказываемый катионами на активность полимеразы Bst 3.0, существенно различался. Mn^{2+} оказался наилучшим альтернативным кофактором (рис. 3.45А и 3.45Б, кривая 2), однако амплификация шла также в присутствии Cd²⁺, Cu²⁺ и Ca²⁺ (рис. 3.45А и 3.45Б, кривые 3, 4, 5). Ni²⁺, Zn²⁺ и Co²⁺ не активировали полимеразу Bst 3.0, т.к. ни специфическая, ни неспецифическая амплификация не протекали (рис. 3.45А и 3.45Б, кривые 6-8). Электрофоретический анализ подтвердил накопление продуктов, свойственных АКК и MM (рис. 3.45В и 3.45Г). Наименьшее количество ДНК-продуктов и наименьшая процессивность Bst 3.0 наблюдалась в образцах, содержащих Ca²⁺. Наиболее четкие полосы мультимеров получены для образцов с Mn²⁺ (рис. 3.45Г).

Исследование полимеразной активности было проведено для всех указанных ДНКполимераз, буферов и катионов. Следует отметить, что буферы Thermopol-C, Isothermal-C и Isothermal II-C отличались только концентрацией KCl (10 мM, 50 мM и 100 мM соответственно). Taq-C и Taq-ME-C отличались бо́льшим содержанием Tris-HCl. Taq-ME-C был единственным буфером, содержавшим β-меркаптоэтанол. Обнаружено, что помимо
Mg^{2+} , амплификация проходит в присутствии Mn^{2+} при использовании всех буферов, кроме Thermopol-C, но в большинстве случаев эффективность амплификации с Mn^{2+} был ниже, чем с Mg^{2+} (табл. 3.19). В буфере Taq-ME-C полимеразы Bst LF и Bst 3.0 также проявляли активность с Ca^{2+} , Cd^{2+} и Cu^{2+} . Таким образом, при определенных условиях полимеразы Bst exo⁻ могут использовать помимо Mg^{2+} также Mn^{2+} , Ca^{2+} , Cd^{2+} и Cu^{2+} для эффективного синтеза ДНК. Однако стоит отметить, что возможно изменение характера зависимости эффективности изотермической амплификации при изменении концентрации соответствующих катионов.

Различия в протекании амплификации в буфере Taq-ME-C по сравнению с остальными буферами связаны с присутствием в нем β-меркаптоэтанола. Следует отметить, что во время подготовки образцов для амплификации с этим буфером соли никеля, кобальта и меди приводили к выпадению окрашенных осадков, что объясняется, очевидно, низкой растворимостью сульфидов данных металлов. Однако отдельное смешивание водных растворов солей указанных металлов и β-меркаптоэтанола в концентрациях, соответствующих реакционным, с последующим внесением данных смесей в амплификационные образцы не привело к изменению течения реакций, при этом осадки сульфидов не образовывались.

Поскольку широко признанным является двухкатионный механизм активации ДНК-полимераз [Tsai, 2019] и 3D-структура 1LV5 полимеразы Bst exo- в базе PDB содержит два катиона в активном центре (Mg²⁺ и Mn²⁺), дальнейшие амплификационные эксперименты проводили, добавляя в реакционные смеси пары катионов (Mg²⁺ и один из альтернативных катионов, взятые в эквимолярных концентрациях по 1,25 мМ). В качестве контроля выступали образцы, содержавшие только Mg²⁺ (табл. 3.19). Мы предположили, что активность полимеразы может измениться в присутствии катионов двух разных металлов, и добавление альтернативных катионов, возможно, будет препятствовать протеканию ММ. Действительно, сочетания катионов по-разному влияли на амплификацию 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 (Mg²⁺/Mn²⁺, Mg²⁺/Ca²⁺, Mg²⁺/Cu²⁺, Mg²⁺/Ni²⁺, Mg²⁺/Cd²⁺ для буферов Isothermal II-С и Таq-МЕ-С) ионных пар. Наименьшее ингибирование специфической и неспецифической реакций наблюдалось для буферов с высокой концентрацией соли, вероятно, из-за большей конформационной жесткости комплексов в этой среде. Высокая специфичность амплификации обнаружена для полимераз Bst exo⁻ в присутствии Mn²⁺ в Isothermal-C, однако продолжительность реакции была в данном случае очень высокой (>1 ч).

Буфер	Катион	Bst	LF	Bst	2.0	Bst 3.0		
туфер	Катион	CTc*	LTc*	СТс	LTc	СТс	LTc	
	Mg ²⁺ (2,5 мМ)	18,8±1,2	68,3±8,2	20,4±1,0	59,7±7,1	23,0±1,4	56,7±4,7	
ol-C	Mg ²⁺ (1,25 мМ)	41,3±3,8	92,5±10,9	26,7±0,9	114,7±10,5	32,5±1,7	125,9±11,2	
nope	Mn^{2+}	-	-	-	-	119,2±8,9	-	
heri	Mg^{2+}/Mn^{2+}	13,5±1,4**	144,2±16,6	15,7±1,0	47,5±3,5	16,4±1,1	85,0±25,9	
Ĩ	Mg^{2+}/Ca^{2+}	45,8±1,9	150,2±8,6	35,0±2,4	92,3±9,5	136,7±12,0	-	
nal-C	Mg ²⁺ (2,5 мМ)	12,5±1,1	51,3±5,5	16,5±1,2	45,1±6,2	8,3±0,5	25,9±3,2	
	Mg ²⁺ (1,25 мМ)	31,7±2,3	99,6±9,4	17,3±1,1	54,2±8,5	18,8±0,7	71,4±7,5	
	Mn ²⁺	101,4±6,3	-	93,3±4,5	-	65,5±2,4	-	
ther	Mg^{2+}/Mn^{2+}	13,5±1,0	107,4±9,2	16,2±0,7	86,7±12,5	11,4±1,2	50,6±18,8	
Iso	Mg^{2+}/Ca^{2+}	50,7±0,9	-	43,8±3,1	-	72,7±8,4	170,0±10,2	
	Mg^{2+}/Cu^{2+}	-	-	165,0±11,9	-	104,2±5,9	-	
	Mg ²⁺ (2,5 мМ)	31,7±2,4	96,7±14,6	10,8±0,5	25,0±2,4	5,7±0,4	16,3±4,2	
	Mg ²⁺ (1,25 мМ)	132,0±4,7	-	35,9±1,2	35,9±1,2 103,1±11,6		61,7±21,4	
-C	Mn^{2+}	-	-	62,7±2,8	-	44,2±1,8	-	
lal II	Mg^{2+}/Mn^{2+}	28,3±0,7	-	12,2±1,6	26,7±9,4	15,0±1,8	45,0±11,7	
nerm	Mg^{2+}/Ca^{2+}	53,5±3,9	-	31,4±2,3	78,3±7,1	103,3±7,8	-	
Isotl	Mg^{2+}/Cu^{2+}	-	-	58,4±11,8	145,9±5,9	105,0±2,4	-	
	Mg^{2+}/Ni^{2+}	-	-	143,3±9,7	-	$108,4{\pm}11,8$	-	
	Mg^{2+}/Co^{2+}	-	-	100,0±4,7	-	48,3±4,6	101,7±21,2	

Таблица 3.19. Средние значения порогового времение Tt (мин), полученные при амплификации LTc и CTc в разных буферах в присутствии катионов металлов.

	Mg ²⁺ (2,5 мМ)	8,7±0,5	37,5±3,5	13,5±1,0	35,0±7,1	20,0±1,2	44,2±3,5
	Mg ²⁺ (1,25 мМ)	15,0±1,0	76,2±17,2	7,5±1,1	27,5±5,9	7,4±2,3	29,8±9,5
	Mn ²⁺	-	-	65,0±2,4	-	38,4±2,4	121,7±12,0
ç	Cu^{2+}	-	-	-	-	116,±13,5	-
Taq	Mg^{2+}/Mn^{2+}	25,8±2,0	85,0±9,1	9,8±1,0	30,0±4,4	8,5±1,1	43,6±14,1
	Mg^{2+}/Ca^{2+}	53,1±1,8	162,4±10,7	30,8±2,0	95,3±14,7	55,0±2,1	122,5±9,7
	Mg^{2+}/Cu^{2+}	21,7±2,3	80,0±23,6	16,7±1,5	51,9±11,8	13,3±0,9	60,8±10,6
	Mg^{2+}/Zn^{2+}	-	-	94,5±12,6	-	-	-
	Mg ²⁺ (2,5 мМ)	9,5±1,7	27,9±2,6	26,7±0,8	53,3±2,5	19,5±1,1	30,9±5,9
	Mg ²⁺ (1,25 мМ)	18,4±2,3	79,2±12,4	7,8±0,7	51,1±9,5	5,0±0,8	34,7±13,2
	Mn^{2+}	17,5±1,1	105,4±8,3	68,2±3,0	-	11,9±1,7	25,3±2,1
	Ca^{2+}	61,7±11,8	168,8±12,9	-	-	55,7±2,6	110,5±10,6
C	Cu^{2+}	62,6±4,7	-	-	-	42,0±0,4	128,7±11,8
-ME	Cd^{2+}	54,8±2,4	88,2±42,4	73,5±5,5	162,0±11,8	31,7±3,1	96,7±4,7
Taq	Mg^{2+}/Mn^{2+}	15,1±0,8	-	20,4±2,1	-	5,7±0,5	31,7±2,3
	Mg^{2+}/Ca^{2+}	35,0±2,4	-	38,3±0,6	-	38,4±2,3	119,2±8,4
	Mg^{2+}/Cu^{2+}	26,7±1,3	-	35,9±5,2	105,7±16,9	12,8±2,2	99,2±62,4
	Mg^{2+}/Ni^{2+}	-	-	-	-	154,4±23,6	-
	Mg^{2+}/Cd^{2+}	-	-	-	-	7,1±0,3	28,7±1,9

* CTc – кольцевая матрица, LTc – линейная матрица. ** Жирным шрифтом выделены комбинации катионов и полимеразы, обеспечивающие наиболее высокие скорость и специфичность амплификации.

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+} . Данные комбинации могут быть рекомендованы как наиболее оптимальные для повышения специфичности амплификации с полимеразами Bst exo⁻. Для других катионных пар MM протекала также эффективно, как и в присутствии только Mg^{2+} , что не обеспечивало получения достоверного результата.

Очевидно, что кофактор оказывает влияние на строение фермент-субстратного комплекса и, как следствие, на эффективность синтеза ДНК. Для оценки влияния ионов на стабильность комплексов "полимераза-ДНК" был проведен докинг четвертичных структур, содержащих полимеразу, ДНК, трифосфат и катионы металлов с помощью программы Schrödinger Suite 2016-4. Применимость данного ПО для изучения подобных комплексов была показана ранее [Johnson et al., 2003; Poongavanam et al., 2014]. Для моделирования были взяты закрытая форма полимеразы Bst exo⁻ (1LV5), короткий ДНК-дуплекс, трифосфат дЦТФ и катионы металлов, в том числе их попарные комбинации.

Ионы металлов размещали в позициях A и B фермента, затем оптимизировали комплексы с помощью модуля Protein Preparation Wizard и находили их характеристики с помощью модуля Glide Docking. Комплексы визуализировали в виде ДВЛ, позволивших определить тип и количество химических связей между трифосфатом и активным сайтом фермента (рис. 3.46). На рисунке 3.46 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. 3.46. 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 – π - π взаимодействия.

Ключевым компонентом комплексов "полимераза-ДНК-трифосфат-катионы" является молекула трифосфата, которая связывается ионными (солевой мостик, sb) и водородными (H) связями с окружением: аминокислотами, катионами и ДНК. ДВЛ показали, что трифосфат связывается водородными и ионными связями с несколькими аминокислотами, а также посредством водородных связей и π-π-взаимодействий (стэкингвзаимодействий) с ДНК (таблица 3.20). Катионы взаимодействуют только с атомами кислорода α- и γ-фосфатных остатков трифосфата. Активный сайт содержит также две или три молекулы воды, которые связываются водородными связями с аминокислотами, трифосфатом и ДНК. Простой расчет общего числа химических связей в комплексах позволил определить относительные значения индекса связывания R, которые характеризуют стабильность структур. Обнаружено, что комплексы, содержащие два иона Mg^{2+} или ионы Mg^{2+} и Mn^{2+} , имеют наибольшие значения R, в то время как комплексы, содержащие Co^{2+} , Ni²⁺ и Zn²⁺, характеризуются наименьшими значениями R. Этот результат хорошо согласуется с результатами амплификационных экспериментов, которые показали бо́льшую активность полимеразы Bst LF в буферах с Mg²⁺ и Mn²⁺. Данные катионы имеют схожие ионные радиусы ($Mg^{2+} - 0.86Å$; $Mn^{2+} - 0.81Å$), формируют октаэдрические комплексы и эффективно снижают значения pK_a (Mg²⁺ – 11,4; Mn^{2+} – 10,1) [Vashishtha, Konigsberg, 2018]. Однако, в отличие от Mg^{2+} , Mn^{2+} – более поляризуемый ион, способный к более прочному связыванию с трифосфатом, что увеличивает скорость, но снижает селективность встраивания нуклеотидов. По-видимому, Mg²⁺ и Mn²⁺ обладают дополняющими свойствами, что способствует их хорошей совместимости и пригодности для совместного применения в качестве кофакторов для полимераз, по сравнению с другими катионами. Несмотря на то, что синтез ДНК успешно протекал в присутствии Mn²⁺, молекулярный докинг показал относительно низкие значения R для данного катиона. Вероятно, подходы in silico на данный момент не способны учесть все факторы, оказывающие влияние на взаимодействия в сложных молекулярных системах. Средние значения R получены для Ca²⁺, Cd²⁺ и Cu²⁺, что согласуется с данными по буфер-зависимой селективности активации Bst exo⁻.

Для предварительной оценки влияния кофакторов на точность встраивания нуклеотидов секвенировали продукты изотермической амплификации, проведенной с помощью ДНК-полимераз Bst LF и Bst 3.0 для матриц LTc и CTc. Их структура была схожа со структурой ампликонов, описанных выше (раздел 3.4.1.); они содержали однонаправленные олигонуклеотидные повторы и имели делеции размером в среднем 3-4 нт на 3'- или 5'-концах на стыках повторов (рис. 3.47). Самые протяженные делеции между повторами наблюдались в мультимерах, синтезированных в присутствии Mn²⁺.

полож	кение		связывание дЦТФ с:										связывание Н2О с:			общее количество	
кати	юна			am	инокисл	отами (а	а/к)		катио	нами			,		H-	ионных	связыв
А	В	R615	Q656	I657	E658	H682	R702	R706	Α	В	днк	дЦТФ	а/к	днк	связей	связей	ания К
Mg^{2+}	Mn^{2+}		1 H	1 H		1 H	1 H +1 sb	1 H + 3 sb	2 sb	4 sb	3 H + 2 π-π	3 H	2 H	1 H	14	10	24
Mg^{2+}	Mg^{2+}		1 H	1 H	1 H	1 H	1 H +1 sb	1 H + 2 sb	2 sb	4 sb	3 H + 2 π-π	3 H	2 H	1 H	15	9	24
Mn ²⁺	Mg^{2+}	1 H		1 H	1 H	1 H	1 H +1 sb	1 H + 2 sb	2 sb	4 sb	3 Н + 2 л-л	3 H	2 H	1 H	15	9	24
Ca ²⁺	Mg^{2+}		1 H	1 H		1 H	2 sb	1 H + 3 sb	1 sb	4 sb	3 Н + 2 л-л	3 H	2 H	1 H	13	10	23
Mg^{2+}	Cd^{2+}		1 H	1 H		1 H	1 H +1 sb	3 sb	2 sb	4 sb	3 H + 2 π-π	3 H	2 H	1 H	13	10	23
Cu^{2+}	Cu^{2+}		1 H	1 H		1 H	1 H + 2 sb	3 sb	1 sb	4 sb	3 H + 2 π-π	3 H	2 H	1 H	13	10	23
Cd^{2+}	Cd^{2+}	1 H		1 H		1 H	1 H +1 sb	3 sb	2 sb	4 sb	3 H + 2 π-π	3 H	2 H	1 H	13	10	23
Mg^{2+}	Co ²⁺		1 H	1 H		1 H	1 H +1 sb	3 sb	2 sb	4 sb	3 H + 2 π-π	3 H	2 H	1 H	13	10	23
Ca ²⁺	Ca^{2+}	1 H	1 H	1 H	1 H	1 H	2 sb	2 sb	1 sb	4 sb	3 Н + 2 л-л	3 H	2 H	1 H	14	9	23
Cu^{2+}	Mg^{2+}		1 H		1 H		2 H + 2 sb	4 sb	2 sb	3 sb	3 H + 2 π-π	2 H	1 H	1 H	11	11	22
Mg^{2+}	Ca^{2+}				1 H	1 H	1 H +1 sb	3 sb	2 sb	4 sb	3 H + 2 π-π	3 H	2 H	1 H	12	10	22
Cd^{2+}	Mg^{2+}		1 H	1 H	1 H	1 H	2 sb	2 sb	1 sb	4 sb	3 H + 2 π-π	3 H	2 H	1 H	13	9	22
Co ²⁺	Mg^{2+}	1 H	1 H	1 H		1 H	2 sb	2 sb	1 sb	4 sb	3 Н + 2 л-л	3 H	2 H	1 H	13	9	22
Mn ²⁺	Mn^{2+}		1 H	1 H		1 H	2 sb	2 sb	1 sb	4 sb	3 H + 2 π-π	3 H	2 H	1 H	12	9	21
Mg^{2+}	Cu^{2+}		1 H	1 H		1 H	2 sb	2 sb	1 sb	4 sb	3 Н + 2 л-л	3 H	2 H	1 H	12	9	21
Mg^{2+}	Ni ²⁺				1 H		2 H + 1 sb	3 sb	1 sb	4 sb	3 H + 2 π-π	3 H	2 H	1 H	12	9	21
Co ²⁺	Co ²⁺		1 H	1 H		1 H	2 sb	2 sb	1 sb	4 sb	3 H + 2 π-π	3 H	2 H	1 H	12	9	21
Ni ²⁺	Mg^{2+}		1 H		1 H		3 H	1 H + 3 sb	2 sb	3 sb	3 H + 2 π-π	2 H	1 H	1 H	13	8	21
Mg^{2+}	Zn^{2+}		1 H	1 H	1 H	1 H	2 sb	3 sb	1 sb	4 sb	1 Н + 2 л-л	2 H	2 H	1 H	10	10	20
Ni ²⁺	Ni ²⁺		1 H		1 H		2 sb	2 sb	1 sb	4 sb	3 H + 2 π-π	3 H	2 H	1 H	11	9	20
Zn^{2+}	Zn^{2+}	1 H					1 H + 1 sb	3 sb	1 sb	4 sb	$3 H + 2 \pi - \pi$	3 H	2 H	1 H	11	9	20
Zn^{2+}	Mg ²⁺		1 H				2 H + 1 sb	3 sb	2 sb	3 sb	$3 H + 2 \pi - \pi$	2 H	1 H	1 H	10	9	19

Таблица 3.20. Количество и тип химических связей, образованных дЦТФ, полимеразой Bst exo- (PDB: 1LV5), ДНК, катионами и молекулами воды.

* Н – водородные связи, sb – ионные связи, π - π - π - π -взаимодействие.

** Приведены данные только для отдельных катионов и их комбинаций с Mg²⁺; данные для всех возможных комбинаций катионов представлены в Приложении (табл. П4).

продукты АКК

			продукть	ы АКК			мультимеры						
референсная	5'~CCTCTTG	CTTTCGCTC	TCGTTCTTTAC	AGAACACAG	CGAGAAGAAG	ACCA~3/	5'~CCTCT1	IGCTTTCGCTC	CTCGTTCTTTAC	AGAACACAG	ACGAGAAGAAG	ACCA~3'	
последовательность	0	10	20	30	40	50	0	10	20	30	40	50	
			.20			100		10	120	100	140	100	
Mg ²⁺ / Bst LF	5'~CCTCTTG CCTCTTG CCTCTTG CCTCTTG	CTTTCGCTC CTTTCGCTC CTTTCGCTC CTTTCGCTC	TCGTTCTTTAC TCGTTCTTTAC TCGTTCTTTAC TCGTTCTTTAC	AGAACACAGA AGAACACAGA AGAACACAGA AGAACACAGA	ACGAGAAGAAG ACGAGAAGAAG ACGAGAAGAAG ACGAGAAGAAG	ACCA~ ACCA~ ACCA~ ACCA~3'	5'~CCTCT TI TI TI	rgetttegete rgetttegete rgetttegete rgetttegete	CTCGTTCTTTAC CTCGTTCTTTAC CTCGTTCTTTAC CTCGTTCTTTAC	AGAACACAGI AGAACACAGI AGAACACAGI AGAACACAG	acgagaagaaga Acgagaagaaga Acgagaagaaga Acgagaagaaga Gcgagaagaagaag	ACCA~ ACCA~ ACCA~ ACCA~3'	
Mn ²⁺ / Bst LF	5' ~CCTCTTG CCTCTTG CCTCTTG	CTTTCGCTC CTTTCGCTC CTTTCGCTC	TCGTTCTTTAC TCGTTCTTTAC TCGTTCTTTAC	AGAACACAGA AGAACACAGA AGAACACAGA	ACGAGAAGAAG ACGAGAAGAAG ACGAGAAGAAG	ACCA~ ACCA~ ACCA~3'	5' ~CCTCTT CCTCTT CCTCTT	rgctttcgctc rgctttcgctc rgctttcgctc	CTCGTTCTTTAC CTCGTTCTTTAC CTCATTCTTTAC	AGAACACAG AGAACACAG AGAACACAG	ACGAG GCGAG ACGAGAAGAAG	~ ~ ACCA~3'	
Mn ²⁺ / Bst 3.0	5' ~CCTCTTGG CCTCTTGG CCTCTTGG	CTTTCGCTC CTTTCGCTC CTTTCGCTC	TCGTTCTTTAC TCGTTCTTTAC TCGTTCTTTAC	АGAACACAGA АGAACACAGA АGAACACAGA	ACGAGAAGAAG ACGAGAAGAAG ACGAGAAGAAG	ACCA~ ACCA~ ACCA~3/	5' ~CCTCT CT CT	IGCTTTCGCTC IGCTTTCGCTC IGCTTTCGCTC IGCTTTCGCTC	CTCGTTCTTTAC CTCGTTCTTTAC CTCGTTCTTTAC CTCGTTCTTTAC	AGAACACAG AGAACACAG AGAACACAG AGAACACAG	ACGAGAAGAAG ACGAGAAGAAG ACGAGAAGAAG ACGAGAAGAAG	ACCA~ ACCA~ ACCA~ ACCA~3'	
Cd ²⁺ / Bst LF	5'~CCTCTTG CCTCTTG CCTCTGG CCTCTGG CCTCTGG	CTTTCGCTC CTTTCGCTC CTTTCGCTC CTTTCGCTC CTTTCGCTC	TCGTTCTTTAC TCGTTCTTTAC TCGTTCTTTAC TCGTTCTTTAC TCGTTCTTTAC	AGAACACAGJ AGAACACAGJ AGAACACAGJ AGAACACAGJ AGAACACAGJ	ACGAGAAGAAG ACGAGAAGAAG ACGAGAAGAAG ACGAGAAGAAG ACGAGAAGAAG	ACCA~ ACCA~ ACCA~ ACCA~ ACCA~3'			N	A			
Cd ²⁺ / Bst 3.0	5' ~CCTCTTGG CCTCTTGG CCTCTTGG	CTTTCGCTC CTTTCGCTC CTTTCGCTC	TCGTTCTTTAC TCGTTCTTTAC TCGTTCTTTAC	AGAACACAGA AGAACACAGA AGAACACAGA	CGAGAAGAAG CGAGAAGAAG CGAGAAGAAG	ACCA~ ACCA~ ACCA~3'	5'~CCTCT CCTCT CCTCT CCTCT	IGCTTTCGCTC IGCTTTCGCTC IGCTTTCGCTC IGCTTTCGCTC	CTCGTTCTTTAC CTCGTTCTTTAC CTCGTTCTTTAC CTCGTTCTTTAC	AGAACACAG AGAACACAG AGAACACAG AGAACACAG	ACGAGAAGAA- ACGAGAAGAA- ACGAGAAGAA- ACGAGAAGAAGAAG	~ ~ ACC-~3′	
Ca ²⁺ / Bst LF	5'~CCACTGG CCTCTTG CCTCTTG	CTTTCGCTC CTTTCGCTC CTTTCGCTC	TCGTTCTTTAC TGGTTCTTTAC TCGTTCTTTAC	АБААСАСАБИ АБААСАСАБИ АБААСАСАБИ	ассадаадаас ассаДаадаас ассадаадаас	ACCA~ ACCA~ ACCA~3'			N	A			
Ca ²⁺ / Bst 3.0	5' ~CCTCTTG CCTCTTG CCTCTTG	CTTTCGCTC CTTTCGCTC CTTTCGCTC	TCGTTCTTTAC TCGTTCTTTAC TCGTTCTTTAC	AGAACACAGJ AGAACACAGJ AGAACACAGJ	ACGAGAAGAAG ACGAGAAGAAG ACGAGAAGAAG	ACCA~ ACCA~ ACCA~3'	5' ~CCTCT CCTCT CCTCT	I <u>CGO</u> TTCGCTC IGCTTTCCTC7 IGCTTCCCTC7	стссттстттас гстсттстттас гс=стстттас	AGAACACAG AGAACACAG AGAACACAG	ACGAGAAGAAG ACGAGAAGAAG ACGAG	A <u>C-A</u> ~ A <u>C-A</u> ~ ~3'	
Cu ²⁺ / Bst LF	5'~CTTG TCTCTTG TCTCTTG	CTTTCGCTC CTTTCGCTC CTTTCGCTC	TCGTTCTTTAC TCGTTCTTTAC TCGTTCTTTAC	АGAACACAGJ АGAACACAGJ АGAACACAGJ	ACGAGAAGAAG ACGAGAAGAAG ACGAGAAGAAG	ACCA~ ACCA~ ACCA~3'			N	A			
Cu ²⁺ / Bst 3.0	5′~сст∃ттс сстсттс сстст©с	CTTTCGCTC CTTTCGCTC	icqqictitac icqtictitac icqqictitac	адаас]сада адаасасада адаасасада	ACGAGAAGAAG ACGAGAAGAAG ACGGGAAGAAG	acca~ acca~ agca~3'	5' ~T T CT CT CT	IGCTTTGCTC IGCTTTCGCTC IGCTTTCGCTC IGCTTGCGCTC IGCTTGCGCTC IGCTTGCGCTC	CTCGCTCTTTAC CTCTTTCTTTAC CCCGTTCTTTAC CTCGCTCTTTAC CCCCCTCTTTAT CTCGTTCTTTAT	Tetacacagi Agaacacagi Agaacacggi Agaa <u>Aggga</u> Agaac <u>ag</u> agi Agaac <u>ag</u> agi	AQ <u>AGCTTCTTC</u> ACGAGAAQGAA ACGAGAAQGAG <u>CGAGAAAGG</u> ACQGGAAQGGQ ACQGGAAQGAG	CGA-~ GCCA~ AGACCG~ TCCGA~ GC~ AAGG~3'	

Рис. 3.47. Нуклеотидные последовательности продуктов, полученных при изотермической амплификации ДНК-матриц LTc и CTc (в качестве примера представлено только по одному риду для разных сочетаний катионов и полимераз, NA – клоны не получены). Ошибочные нуклеотидные вставки и делеции в конкатемерах заключены в рамки. Дефисы соответствуют делециям, тильда (~) показывает разрыв последовательности.

Согласно данным секвенирования, полимераза Bst 3.0 является более точной по сравнению с Bst LF: ошибки синтеза полинуклеотидной последовательности (встраивание некорректных нуклеотидов и делеции внутри повторов) в реакции АКК наблюдались только для образцов, содержавших ионы Cu²⁺ (табл. 3.21).

Таблица 3.21. Количество ошибок синтеза полинуклеотидной последовательности в ходе
изотермической амплификации ДНК-матриц LTс и CTс под действием ДНК-полимераз
Bst LF и Bst 3.0 в присутствии катионов соответствующих металлов (количества ошибок
синтеза приведены из расчета на 1000 п.н., повторы ошибок в структуре продуктов в
расчет не принимались).

катион	Bst	LF	Bst 3.0			
Ruthon	LTc	СТс	LTc	СТс		
Mg ²⁺	1	1	0	0		
Mn ²⁺	6	1	2	0		
Ca ²⁺	NA*	25	24	0		
Cd ²⁺	NA	4	1	0		
Cu ²⁺	NA	8	164	52		

* NA – данные не получены.

В случае Bst LF встраивание заметного количества некорректных нуклеотидов обнаружено в продуктах, полученных для образцов, содержавших Cd^{2+} , Ca^{2+} и Cu^{2+} , но не Mn^{2+} , хотя неоднократно было показано, что Mn^{2+} приводит к возникновению ошибок при репликации [Wang et al., 2011]. Для Mn^{2+} единичные однонуклеотидные замены были обнаружены в нескольких клонах, соответствующих мультимерам. Среди прочих катионов, наименьшая частота ошибочных вставок обеспечивалась в присутствии Cd^{2+} . Наиболее значительные нарушения в активности полимеразы наблюдались при использовании буфера с Cu^{2+} . В данном случае возникали не только замены отдельных нуклеотидов, но и относительно протяженные (10-12 нт) сайты со случайными последовательностями. Несмотря на то, что нарушение функций полимеразы было существенным, синтез ДНК и амплификация все же были возможны в этом случае.

Таким образом, обнаружено, что Bst ехо- при определенных условиях 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 ионами Mg^{2+} ингибирует протекание мультимеризации. Согласно данным молекулярного докинга, Bst ехо- образует чуть более прочные комплексы с пуринбогатыми последовательностями, что обусловливает бо́льшую эффективность мультимеризации для ДНК-матриц, содержащих олигопуриновые концевые мотивы.

3.5. НОВЫЕ СПОСОБЫ И ПРИЕМЫ НК-АНАЛИЗА

3.5.1. Демонстрация возможностей ПЦР со сближенными праймерами

Как было показано выше, ПЦР со сближенными праймерами характеризуется более высокими специфичностью и чувствительностью, менее чувствительна к действию ингибирующих агентов, оптимально подходит для амплификации разрушенных НК. В данной части работы показаны преимущества использования сближенных праймеров при обнаружении разрушенных НК, выделенных из различных биоматериалов.

3.5.1.1. Обнаружение ДНК-мишеней в разрушенных биоматериалах

Демонстрацию возможностей ПЦР-амплификации разрушенной ДНК с помощью сближенных праймеров провели в нескольких экспериментах. В первом выделили ДНК из древесной трухи, взятой из самого нижнего бревна деревянного дома, построенного в 1914 г. (рис. 3.48А). Возраст древесины, судя по толщине бревна, составил около 60 лет. Происхождение древесины, из которой построен дом, было неизвестно, поэтому подбирали праймеры к ДНК древесных растений, наиболее используемых в России для строительства: сосны, лиственницы, ели и дуба (табл. 2.4, №№109-124). Очевидно, что древесина длительно подвергалась воздействию широкого круга неблагоприятных факторов внешней среды: светового излучения, кислорода воздуха, природных осадков и др. Попытка определить видовую принадлежность древесины путем однократной амплификации не дала положительного результата. Даже длительное термоциклирование (45-60 циклов) с использованием праймеров "встык" не обеспечило образования целевых ампликонов. Полное отсутствие продуктов ПЦР, в том числе неспецифических, свидетельствовало об ингибировании реакции. Проблема часто решается проведением реамплификации, и в нашем случае подобный подход позволил добиться наработки специфического продукта, однако только для праймеров "встык", подобранных к ДНК ели (рис. 3.48Б). В то же время многократная реамплификация (4-хкратная) с праймерами к ДНК других древесных растений не увенчались успехом. Для подтверждения вида растения и исключения принадлежности ПД было проведено секвенирование ампликона, подтвердившее принадлежность продукта амплификации к еловой ДНК (рис. 3.48В).

Во втором примере ДНК была выделена из почвы, взятой из-под кроны ели сибирской, растущей в условиях города вблизи оживленной автомагистрали, с целью выявления в ней ДНК ели. Перед забором образца почвы с нее был удален поверхностный слой во избежание попадания в образец относительно свежей еловой хвои.



Рис. 3.48. Определение видовой принадлежности древесной трухи: (А) внешний вид древесной трухи; (Б) электрофореграмма результатов реамплификации с праймерами "встык" к ДНК сосны (дорожка 1), лиственницы (2), ели (3) и дуба (4) (стрелкой отмечен специфический ампликон). (В) результат секвенирования ампликона, полученного при амплификации ДНК из трухи.

Почва подвергается воздействию различных факторов внешней среды: светового излучения, кислорода воздуха, природных осадков, а также факторов техногенного характера (выхлопы автотранспорта, засорение). Она содержит множество источников НК: микроорганизмы, корни растений, перегнившие растительные остатки и пр. Очевидно, что большую часть в анализируемом образце составляла фоновая ДНК, т.е. ДНК из этих источников. Попытка обнаружить ДНК ели в почве после первой амплификации не дала результата, по-видимому, вследствие ингибирования реакции. Данный феномен часто наблюдается при проведении ПЦР с ДНК, выделенной из почвы и растительных объектов, и объясняется присутствием фенольных соединений (гуминовых и фульвовых кислот, полифенолов и др.). Реамплификация позволила получить искомый результат, но только для праймеров "встык" (рис. 3.49).



Рис. 3.49. Электрофореграмма результатов ПЦР с ДНК, выделенной из почвы, и праймерами к ДНК ели: дорожки 1, 3, 5 – праймеры с "традиционным" расположением (PO F/PO R); 2, 4, 6 – праймеры "встык" (PO aF/PO aR); 1, 2 – OK; 3, 4 – образцы реамплификации, 5, 6 – ПК; М – маркер pUC19/MspI.

Другим примером амплификации "сложной" ДНК явились результаты определения ботанического происхождения меда. Мёд – сложная многосоставная субстанция, получаемая в результате ферментативной обработки цветочного нектара медоносной пчелой. Химический состав и биологические свойства мёда зависят от источника нектара, поэтому важно знать его ботаническое происхождение, по которому меда подразделяют на монофлорные (нектар преимущественно одного вида растений) и полифлорные (нет преобладания какого-либо нектара) [Mendes et al., 2009]. На сегодняшний день сорт мёда определяют физико-химическими методами [Castro-Vázquez et al., 2009], с помощью мелиссопалинологического (пыльцевого) анализа [Курманов, Ишбирдин, 2014] и органолептически (ГОСТ Р 52451-2005, ГОСТ Р 19792-2001). Наиболее точен пыльцевой анализ, но он продолжителен, требует особой тщательности при выполнении, его результаты зависят от квалификации и опыта эксперта, поэтому в последнее время получает распространение анализ с помощью ПЦР. Предложено несколько методик выделения ДНК медоносов из меда и её амплификации [Mafra et al., 2008; Lalhmangaihi et al., 2014; Soares et al., 2015].

ДНК выделяли из образцов мёда, произведённых пчеловодческими хозяйствами Республики Башкортостан. Коллекция была представлена липовыми, гречишными, подсолнечниковыми, дудниковым, донниковым и цветочными медами. Сорт мёда устанавливался производителем. Выделение ДНК из мёда осуществляли двумя способами: по собственной методике, включавшей УЗ-облучение в 2M NaCl, и с помощью коммерческого набора (в обоих случаях источником ДНК служил осадок, полученный при растворении меда в воде). Количество выделенной ДНК варьировало в зависимости от сорта меда и методики выделения. Количество ДНК, выделенной с помощью собственной методики, превышало количество ДНК, выделенной с помощью коммерческого набора (табл. 3.22), что объясняется, вероятно, недостаточным разрушением пыльцевых зерен и неполным извлечением из них ДНК в последнем случае.

	Количество	ОДНК (нг)	Сорт м	Источник нектара (по данным ПЦР)							
Образец	УЗ-	Набор для	по данным	подтвержден	А.	Т.	М.	<i>F</i> .	Н.	<i>F</i> .	5 90
	обработка	выделения	производителя	ПЦР-анализом	archangelica	cordata	officinalis	esculentum	annuus	ulmaria	3.85
H1	1680±108	515±16	дудниковый*	+	+						+
H2	1230±74	417±14	цветочный			+					+
H3	2120±147	1210±71	цветочный	+			+			+	+
H7	1800±121	1280±72	цветочный	+		+	+				+
H8	2350±170	655±31	липовый	+	+	+				+	+
H9	831±44	475±20	цветочный			+					+
H10	510±17	430±18	липовый	+	+	+	+			+	+
H11	590±22	975±51	цветочный	+	+	+				+	+
H12	2350±168	1130±59	цветочный	+	+	+					+
H13	2280±161	625±28	липовый	+		+					+
H15	1610±101	525±17	донниковый	+			+				+
H16	1460±88	435±16	цветочный			+					+
H17	1940±132	650±29	цветочный			+					+
H18	1820±120	805±41	липовый	+		+	+				+
H19	1950±134	1160±66	цветочный	+	+	+				+	+
H20	1320±80	455±16	гречишный		+		+				+
H24	2040±141	1105±62	цветочный		+					+	+
H25	2360±168	940±50	подсолнечниковый	+	+	+			+		+
H26	8240±788	735±37	гречишный				+			+	+
H27	540±19	605±27	цветочный	+		+	+			+	+
H28	1680±109	770±39	цветочный		+						+

Таблица 3.22. Результаты установления ботанического происхождения меда с помощью ПЦР (стандартные условия амплификации).

H29	1970±134	825±43	липовый	+		+	+				+
H30	1880±127	480±21	цветочный			+					+
H31	1640±105	1260±74	цветочный	+		+				+	+
H32	510±18	490±16	подсолнечниковый	+					+		+
H33	1140±64	1575±97	цветочный	+			+		+		+
H34	1320±80	815±39	цветочный		+	+					+
H35	2070±142	1130±58	липовый	+		+					+
H38	1070±57	820±41	липовый			+	+			+	+
H39	1720±114	705±34	цветочный	+	+	+	+				+
H40	2010±139	1005±54	цветочный	+	+		+				+
H41	1570±97	460±17	гречишный		+	+				+	+
H44	2320±162	680±33	цветочный					+			+

* жирным шрифтом выделены монофлорные сорта меда.

В качестве растений-медоносов рассматривались липа сердцевидная (T.cordata), подсолнечник однолетний (Helianthus annuus), гречиха посевная (Fagopyrum esculentum), дудник лекарственный (Angelica archangelica), донник лекарственный (Melilotus officinalis), таволга вязолистная (Filipendula ulmaria). Поскольку при анализе гречишного мёда возникли трудности, в качестве медоносов были рассмотрены также гречиха татарская (Fagopyrum tataricum) и гречиха Fagopyrum statice. Для контроля обнаружения растительной ДНК подбирали универсальные праймеры к консервативной последовательности гена 5.8S рРНК. Подбор видоспецифичных праймеров осуществляли к вариабельной части внутреннего транскрибируемого спейсера 1 (табл. 2.7, №№275-292). Поскольку методика выделения ДНК медоносов включала УЗ-обработку биопрепарата, стремились подбирать праймеры к более короткой нуклеотидной последовательности; в результате ПЦР-амплификации с подобранными праймерами ожидали образования ампликонов размером в среднем 136 п.о.

Праймеры, специфичные к липе, позволили обнаружить её ДНК в образцах, полученных из липовых и некоторых цветочных медов (табл. 3.22). Представленность ДНК липы в различных сортах меда объяснима. Период ее цветения, а значит, и сбора пчёлами липового нектара, перекрывается с периодами цветения многих лесных и полевых медоносов (Acer platanoides, Rubus idaeus, Rosa majalis, Chamerion angustifolium, Angelica archangelica, Aegopodium podagraria, Heracleum sibiricum, Melilotus officinalis, Vicia cracca, Trifolium repens, Origanum vulgare). Вследствие этого возможно внесение пчёлами пыльцы *T. cordata* в мёд, определяемый пчеловодами как цветочный или монофлорный иного сорта, что видно по присутствию ДНК липы в образцах цветочных медов. В то же время, в липовом мёде не детектируется ДНК таких культурных растений как гречиха посевная и подсолнечник однолетний, произрастающих на обширных площадях и дающих другие сорта мёда. ДНК подсолнечника обнаруживалась только в образцах, полученных из подсолнечникового мёда, что можно объяснить большой площадью посевов этой культуры. Это даёт пчеловодам возможность достаточно легко собирать монофлорный мёд данного сорта без примесей пыльцы других растений.

При использовании для анализа гречишных медов H20, H26 и H41 праймеров к гречихе посевной образования целевого продукта амплификации не наблюдалось ни в одном из случаев (положительный контроль с ДНК гречихи приводил к наработке специфического продукта). Варьирование условий выделения ДНК с использованием дополнительных видов очистки (спин-колонка, поливинилпирролидон) также не привели к желаемому результату. Вследствие этого были подобраны праймеры, специфичные к гречихе татарской и гречихе *Fagopyrum statice* как к видам, наиболее близким к гречихе

посевной. Однако ПЦР с их участием также не привела к наработке целевых ампликонов. Отсутствие положительного результата свидетельствовало об отсутствии пыльцы гречихи в меде. Успешное протекание ПЦР с универсальными праймерами и праймерами к ДНК других медоносов исключало ингибирование ПЦР. Вероятно, сорт меда был установлен производителями ошибочно. Это возможно, поскольку тёмный мёд с терпким вкусом получается не только при сборе нектара гречихи, но и других растений: луговых и пойменных трав, а также деревьев (вплоть до голосеменных).

На приведенных выше примерах продемонстрирована предпочтительность ПЦРамплификации разрушенной ДНК с помощью сближенных праймеров, и при их качественном подборе возможно получение надежных результатов.

3.5.1.2. Обнаружение разрушенных РНК

Удобным объектом, способным выступать в качестве примера разрушенных НК, является РНК. Данный тип НК подвергается быстрому расщеплению под действием нуклеаз, поэтому к обращению с РНК-содержащими препаратами предъявляют повышенные требования, в частности, соблюдение особых условий при их заборе, хранении, транспортировке. При отклонении от соответствующих правил происходит разрушение РНК до состояния, при котором она не может быть амплифицирована, и становится невозможным достоверное обнаружение специфических мишеней.

В последние годы глобальным вызовом стал РНК-содержащий вирус SARS-CoV-2, вызвавший пандемию COVID-19. Потребность в обнаружении PHK SARS-CoV-2 привела разработке новых подходов, основанных на изотермической амплификации, к микрофлуидных и биосенсорных технологиях, методах геномного редактирования CRISPR, и др. Однако ПЦР до сих пор остается "золотым стандартом" и наиболее используемым методом при диагностике любых инфекционных заболеваний [Sharma et al., 2021; Vindeirinho et al., 2022]. В случае необходимости обнаружения РНК-патогенов непосредственно перед этапом ПЦР-амплификации проводят реакцию обратной транскрипции (ОТ), требующей РНК-зависимой ДНК-полимеразы. Представляется удобным проводить анализ РНК с использованием обычной ПЦР (т. е. без этапа ОТ) только с одним ферментом, обладающим активностью как ДНК-зависимой ДНКполимеразы, так и обратной транскриптазы. Недавно было показано, что оптимизация состава буфера и протокола термоциклирования позволяет с высокой надежностью обнаруживать РНК коронавируса SARS-CoV-2 с помощью полимеразы Taq [Bhadra et al., 2020], у которой уже достаточно давно была обнаружена слабая обратно-транскриптазная активность [Tse, Forget, 1990].

Мы апробировали ДНК-полимеразу Таq нескольких производителей в качестве единственного фермента ПЦР-смеси для обнаружения РНК коронавируса SARS-CoV-2 с помощью обычной ПЦР и праймерной системы (табл. 2.8, №№305-307), представленной на рисунке 3.50. На первом этапе реакции праймер R отжигается на цепи РНК и удлиняется ДНК-полимеразой с обратной транскриптазной активностью, что приводит к соответствующей кДНК. Во время дальнейших стадий праймеры F1 или F2 отжигаются на цепи кДНК, и затем протекает обычная ПЦР. Пара F1/R представляет собой праймеры "встык" и дает короткий ампликон (54 п.о.), в то время как F2 и R приводят к ампликону привычного размера (123 п.о.). Близкое расположение праймеров обеспечивает два преимущества. Во-первых, в случае слабой обратно-транскриптазной активности полимеразе легче перемещаться на небольшое расстояние по матрице РНК и формировать ДНК-ампликон такого размера, который достаточен для дальнейшей ПЦР. Во-вторых, в РНК-препарате с большей вероятностью сохраняются более короткие цепи, пригодные для синтеза специфических ампликонов.



Рис. 3.50. Расположение праймеров F1, F2 и R, сконструированных для амплификации РНК.

Тестировали полимеразы группы Таq производства компаний СибЭнзим (кат. №E332), SynGen (Synta Taq, кат. №ES00001), БелБиоЛаб (Diamant TaqD, кат. №E-TDP-50), TFS (AmpliTaq Gold, кат №N8080240), NEB (Hemo KlenTaq, кат. №M0332), Vazyme (Champagne Taq, кат. №P122). Наилучший результат (наименьшие значения Ct) был получен с ДНК-полимеразой Нето KlenTaq (HKT), хотя, согласно спецификации производителя, она предназначена для проведения классической ПЦР. Дальнейшие эксперименты проводили с этим ферментом.

Для оценки специфичности и чувствительности детекции РНК готовили модельные образцы смешиванием экстрактов мазков пациентов с подтвержденным диагнозом COVID-19. Были получены образец Rmix0 (без замораживания) и образцы Rmix2, Rmix5, Rmix10 и Rmix20, подвергнутые 2-, 5-, 10- или 20-кратным циклам замораживанияоттаивания, соответственно. Была обнаружена значительная разница во времени начала ЭСР для взятых праймерных пар, несмотря на одинаковые температуру отжига праймеров и участок амплификации (рис. 3.51А). Так, праймеры F1/R обеспечивали более быструю амплификацию по сравнению с парой F2/R (Δ Ct > 10 циклов), что связано, вероятно, с изменением процессивности ДНК-полимеразы при использовании РНК в качестве субстрата.



Рис. 3.51. ПЦР-амплификация РНК коронавируса SARS-CoV-2 в реальном времени под действием ДНК-полимеразы НКТ. (А) Разница в скорости амплификации при использовании сближенных (F1/R) и обычных (F2/R) праймеров; (Б) Сравнение эффективности амплификации для Нето KlenTaq и Taq+MMLV (для праймерной пары F1/R); (В) Кривые плавления ПЦР-продуктов, полученных с помощью пар праймеров F1/R (кривые 1 и 3) и F2/R (кривые 4 и 6); (Г) образование специфических (дорожки 1 и 4) и неспецифических (дорожки 3 и 6) продуктов амплификации.

Сближенные праймеры обеспечили бо́льшую эффективность амплификации разрушенной РНК. Так, даже для образца Rmix20 были получены значения Ct, сравнимые с таковыми для исходного образца Rmix0 (рис. 3.51А, кривые 1 и 2). В то же время для пары F2/R разница значений Ct для Rmix0 и Rmix20 достигала ~9 циклов, что указывает на значительное уменьшение количества амплифицируемых РНК-мишеней (рис. 3.51А, кривые 4 и 5). Анализ кривых плавления и гель-электрофорез показали, что повышение флуоресценции в образцах ОК обусловлено образованием неспецифических продуктов, а не димеров праймеров (рис. 3.51В и 3.51Г). Сравнительные эксперименты показали также, что Нето KlenTaq обеспечивает амплификацию РНК с эффективностью, сравнимой с

таковой для ОТ-ПЦР, выполненной с использованием обратной транскриптазы MMLV и ДНК-полимеразы Таq дикого типа (рис. 3.51Б).

Оценку чувствительности детекции РНК коронавируса SARS-CoV-2 проводили путем амплификации разбавленных образцов Rmix0. Хотя количество РНК-мишеней в Rmix0 было неизвестно, ранее сообщалось, что экстракты мазков из носоглотки от COVID-19-положительных индивидов содержат в среднем около 10^4 - 10^5 копий мишени на 1 мкл раствора в зависимости от вирусной нагрузки и метода выделения РНК [Hernández-Vásquez et al., 2022; King et al., 2022; Lee et al., 2021b]. 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 (рис. 3.52A), что свидетельствует о достаточно высокой чувствительности анализа и коррелирует с результатами, полученными ранее другими авторами для ОТ-ПЦР-систем без флуорогенных зондов [Verna et al., 2021].



Рис. 3.52. Оценка чувствительности детекции РНК коронавируса SARS-CoV-2 с помощью Нето KlenTaq. (A) 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 Δ Ct определяли следующим образом: Δ Ct = Ct(NTC) – Ct(RmixN), NTC – отрицательный контроль. Линия при Δ Ct = 5 соответствует порогу клинической значимости.

Эксперименты с многократно замороженными образцами РНК показали в целом уменьшение количества амплифицируемых РНК-мишеней для обеих пар праймеров (рис. 3.52Б). Для праймеров "встык" значения Δ Ct снижались всего на 2-3 цикла, что соответствует менее чем 10-кратному уменьшению количества амплифицируемых мишеней; даже для образца Rmix20 Δ Ct превышала 5 циклов, что позволяет с высокой достоверностью выявлять специфическую РНК. Для праймеров F2/R снижение значения

ΔCt составило >5 циклов даже для образца Rmix5, что указывает на значительное снижение копийности мишени; обнаружение PHK патогена в этом случае можно считать недостаточно надежным. Таким образом, сближенные праймеры обеспечивают эффективное обнаружение разрушенных PHK, что позволяет предъявлять щадящие требования к транспортировке и хранению PHK-содержащих материалов, используемых далее для молекулярной диагностики.

3.5.1.3. Конвекционная ПЦР

Потребность в проведении экспресс- и полевой диагностики обусловливает 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 (в этом случае перемещение осуществляется в замкнутом контуре – капиллярах или трубках), либо ее частей в пределах реакционного сосуда (в этом случае происходит термоконвекция). Второй вариант можно считать вариантом истинной конвекции.

Главной проблемой конвПЦР является необходимость использования нестандартных реакционных сосудов. Нами реализован вариант проведения реакции в стандартных полипропиленовых ПЦР-пробирках, для чего была сконструирована специальная установка, состоящая из двух алюминиевых пластин, разделенных термоизолятором, с отверстиями для обычных ПЦР-микропробирок объемом 0,2 мл. Температура каждой пластины регулировалась элементами Пельтье, а контакт микропробирок с пластинами происходил в двух точках площадью около 2 мм² каждая (рис. 3.53А).

Моделирование тепловых процессов проводилось коллегами из Института механики УФИЦ РАН в двумерном приближении для прямоугольной конвекционной ячейки, заполненной чистой водой. В качестве модели была задана несжимаемая жидкость с постоянной вязкостью. Было сделано допущение, что температура жидкости определяет ее плавучесть, а химические процессы не влияют на механику жидкости [Moiseev et al., 2013]. Моделирование 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. 3.53Б и 3.53В).



Рис. 3.53. Компьютерная симуляция процессов в конвекционной ячейке с наклонным градиентом температур. (А) Схема распределения температуры и движения жидкости в микропробирке для ПЦР (черными элементами обозначены зоны подачи температуры отжига (Пельтье 1) и денатурации (Пельтье 2)). (Б) и (В) Результаты компьютерного моделирования тепловой конвекции. Распределение температуры (Б) и траектории потока (В) в прямоугольных ячейках, расположенных либо вертикально (90°), либо под углом (45°). Внешние синие и красные элементы обозначают зоны подвода температуры (50°С и 100°С соответственно). Приведены абсолютные значения температуры (градусы Цельсия) и вектора скорости (м/с для вертикальной составляющей вектора скорости).

Для визуализации реального движения жидкости в микропробирке использовали окрашенные частицы, полученные сополимеризацией акриламида с производным малахитового зеленого согласно [Bunemann, 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. При таком движении жидкость, пройдя высокотемпературную зону (денатурация), а затем промежуточную зону, достигает низкотемпературной зоны (отжиг), а затем снова оказывается в промежуточной зоне (элонгация). Однако жидкость в центральной части пробирки описывает меньший путь, и молекулы ДНК, расположенные в этой области, могут не попасть в зону высокой температуры, а значит, могут не подвергнуться полной денатурации. Следовательно, реальное количество эффективных циклов ПЦР окажется меньшим, но за счет диффузии и течения жидкость из центральной части пробирки будет все же перемещаться, и молекулы ДНК смогут принимать участие в указанных процессах. Аналогично, слои жидкости, прилегающие к стенкам пробирки, имеют меньшую скорость движения из-за трения.

Варьируя объем жидкости, определили, что оптимальный температурный режим устанавливается в том случае, когда ее объем обеспечивает высоту столба жидкости примерно в три раза больше ширины (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 бо́льших (до 100 мкл), и в меньших (от 40 мкл) объемах реакционной смеси, но эффективность реакции в этих случаях ниже.

Очевидно, что при подаче температуры (нагрева или охлаждения) на внешнюю поверхность стенки пробирки температура внутри нее будет иной. Поэтому были определены температуры внешних точек нагрева и охлаждения, обеспечивающие оптимальную температуру внутри пробирки: 95°C для зоны денатурации и ~60°C для зоны отжига праймеров. Для этого внутри пробирки с помощью термопар фиксировалась температура жидкости в зонах нагрева и охлаждения. Оказалось, что температура зоны денатурации во внутренней, пристенной области пробирки достигается при поддержании температуры внешней зоны на уровне 145°C, тогда как для зоны отжига – 0°C. Тестирование ПЦР-пробирок разных производителей показало, что возможная разница в толщине стенок не влияет на протекание конвПЦР.

Поскольку продолжительность одного цикла конвПЦР составляет всего несколько секунд, далее оценивали эффективность амплификации фрагментов ДНК различной длины. Использовали праймеры к ДНК пчелы (табл. 2.4, №№91-97), обеспечивающие образование ампликонов длиной 38, 55, 75, 99 и 255 п.о. (рис. 3.54А).



Рис. 3.54. Расположение праймеров при ПЦР-амплификации ДНК пчелы медоносной (А) и РНК коронавируса SARS-CoV-2 (Б).

Для указанных пар праймеров определяли чувствительность и специфичность конвПЦР, а также оценивали влияние угла наклона пробирок на эффективность реакции. Оказалось, что в конвПЦР успевают синтезироваться в достаточном количестве только короткие ампликоны (до 100 п.о.) (рис. 3.55А). Для накопления детектируемого количества ампликонов потребовалось около 15 мин (рис. 3.55Б).



Рис. 3.55. Результаты конвПЦР (для 70 мкл реакционного объема). (А) Обычная ПЦР (дорожки 1-5) и конвекционная ПЦР (дорожки 6-10): дорожки 1 и 6 – пара праймеров AM aF/AM aR, 2 и 4 – AM nF1/AM nR1, 3 и 8 – AM nF2/AM nR2, 4 и 9 – AM nF3/AM nR3, 5 и 10 – AM F/AM R. (Б) Продолжительность конвПЦР: дорожка 1 – 5 мин, 2 – 10 мин, 3 – 15 мин (для пары AM aF/AM aR и 10⁶ копий мишени). (В) Чувствительность конвПЦР: дорожка 1 – 10⁵, 2 – 10⁴, 3 –10³, 4 – 10², 5 – 10¹ (для пары AM aF/AM aR и продолжительности реакции 15 мин). (Г) Влияние наклона пробирки на эффективность конвПЦР: дорожка 1 – 30°, 2 – 60°, 3 – 90°. (М – маркер pUC19/MspI).

Увеличение продолжительности реакции до 20 мин не приводило к накоплению неспецифических продуктов, но при продолжительности реакции более 25-27 мин наблюдалось заметное их образование (данные не приведены), поэтому не рекомендуется проведение конвПЩР в течение более 20 мин. Варьированием количества исходной ДНК определен предел чувствительности конвПЩР, который составил 10³ копий мишени (рис. 3.55В).

Протекание конвПЦР зависит от движения жидкости. Мы 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° (рис. 3.55Γ). В вертикальном положении (90°) амплификация не протекала вовсе, очевидно, из-за отсутствия ламинарного движения потоков жидкости и, как следствие, нарушения температурного режима в пробирке.

Имеются единичные исследования, посвященные обнаружению вирусных РНК с помощью конвПЦР [Zhang et al., 2020]. Нами была оценена применимость такого режима реакции для амплификации РНК SARS-CoV-2 из назофарингеальных мазков, полученных от пациентов с подозрением на COVID-19. Использовали праймеры srs-F и srs-R к нуклеотидной последовательности гена *S* (табл. 2.8, №№308, 309), дающие продукт размером 62 п.о. (рис. 3.54Б). Предварительно для всех образцов проводили реакцию ОТ с последующей конвПЦР в 40 мкл реакционного объема при наклоне пробирок в 30° и продолжительностью 15 мин. КонвПЦР, проведенная при указанных условиях, обеспечила образование специфического продукта в образцах, соответствующих SARS-CoV-2-положительным пациентам.

Результаты конвПЦР хорошо коррелировали с результатами, полученными с помощью обычной ПЦР (табл. 3.23). Для SARS-CoV-2-положительных образцов (со значениями Ct<39 циклов по данным конвПЦР) результаты обоих вариантов реакции совпали и позволили установить наличие РНК коронавируса. Для SARS-CoV-2-сомнительных и SARS-CoV-2-отрицательных образцов (Ct≥39) конвПЦР в большинстве случаев показала отсутствие РНК коронавируса.

Стоит отметить, что проведение ПЦР в режиме термоконвекции оправдано при использовании системы сближенных праймеров; в противном случае возможно получение отрицательных или недостоверных результатов.

образец	стандартная ПЦР		конвПЦР***	образец	стандар	гная ПЦР	конвПЦР
	Ct*	статус**	статус		Ct	статус	статус
Nº1	27	+	+	Nº26	29	+	+
Nº2	25	+	+	Nº27	30	+	+
Nº3	31	+	+	Nº28	28	+	+
Nº4	28	+	+	Nº29	40	сомнит.	-
N⁰5	33	+	+	№ 30	40	сомнит.	-
Nº6	32	+	+	Nº31	40	сомнит.	-
Nº7	24	+	+	№ 32	41	сомнит.	-
Nº8	37	+	+	Nº33	40	сомнит.	+
Nº9	26	+	+	№ 34	40	сомнит.	-
№ 10	25	+	+	№ 35	40	сомнит.	-
Nº11	32	+	+	Nº36	40	сомнит.	+
№12	30	+	+	Nº37	41	сомнит.	-
№13	34	+	+	Nº38	41	сомнит.	-
№14	31	+	+	№ 39	40	сомнит.	+
№15	28	+	+	Nº40	45	-	-
№ 16	25	+	+	№ 41	44	-	-
№17	33	+	+	Nº42	43	-	-
№ 18	34	+	+	Nº43	48	-	-
№19	36	+	+	Nº44	42	-	-
№20	27	+	+	Nº45	51	-	-
№ 21	29	+	+	Nº46	45	-	-
№22	26	+	+	№47	42	-	-
№23	35	+	+	№48	46	-	-
№24	29	+	+	№49	44	-	-
№25	35	+	+	№50	42	-	-

Таблица 3.23. Сравнение результатов анализа образцов на наличие в них генетического материала SARS-CoV-2, проведенного с помощью стандартной ПЦР и конвПЦР.

* Ct - пороговый цикл (мин).

** "+" – SARS-CoV-2-положительные образцы, "-" – SARS-CoV-2-отрицательные образцы, "сомнит." – образцы с неоднозначным результатом ПЦР.

*** продолжительность реакции составила 15 мин.

3.5.1.4. Определение половой принадлежности биоматериалов человека

Для определения половой принадлежности биологических материалов человека по ДНК ранее было предложено использовать несколько разных генетических локусов, специфичных для Х- и Y-хромосом. Разработка ПЦР открыла широкие возможности по детекции последовательностей, специфичных для половых хромосом: ZFX и ZFY [Page et al., 1987], DYZ1, DXZ4, DYZ5 [Nicklas, Buel, 2006], разных участков генов амелогенина [Mannucci et al., 1994]. Однако из-за относительно частых нарушений в их структуре ДНКанализ не всегда дает однозначный результат [Acién, Acién, 2020]. Так, хотя со временем амелогениновые локусы AMELY и AMELX стали основными при определении пола человека, у некоторых мужчин амелогениновый ген на Y-хромосоме не выявляется [Borovko et al., 2015]. Для некоторых популяций данная проблема стоит довольно остро, например, для индийской популяции [Kashyap et al., 2006].

Известно, что Х- и Y-хромосомы обмениваются генетическим материалом в норме в пределах псевдоаутосомной области (ПАО), но иногда генетическая рекомбинация происходит и за ее границами, приводя к аномалиям, когда появляются женщины ХҮ и мужчины ХХ. У последних TDF-участки Y-хромосомы, несущие в том числе ген *SRY*, транслоцированы на короткое плечо X-хромосомы. Причем ген *SRY* располагается очень близко к ПАО, что способствует его переносу на X-хромосому чаще остальных локусов (рис. 3.56).



Рис. 3.56. Локализация генов *NLGNX/Y*, *AMELX/Y*, *ZFX/ZFY*, *SRY* на половых хромосомах человека относительно псевдоаутосомной области (ПАО).

Для XY женщин TDF-участок изменен настолько, что не выполняет своей функции. Соответственно, при использовании SRY-маркера в ПЦР-анализе пол у таких людей будет определен неверно, по крайней мере, не будет соответствовать фенотипу. Таким образом, определение пола у людей в целях ДНК-криминалистики представляет собой более сложную задачу, чем представлялось ранее с учетом классических представлений о мужчинах и женщинах как носителях XY- и XX-кариотипов.

Недостатки гендерных ДНК-локусов, используемых для установления пола, обусловливают поиск новых маркеров. На наш взгляд, в качестве гендер-специфичных локусов могут служить фрагменты генов нейролигина *NLGN4X* и *NLGN4Y*, находящиеся, с

одной стороны, относительно недалеко от ПАО, но в то же время существенно различающиеся по расположению (рис. 3.56). *NLGN4Y* находится дальше от рекомбинирующего участка, нежели локусы *AMELY*, *ZFY* и тем более *SRY*, расположенный чуть ли не вплотную к ПАО. Данные преимущества обусловливают возможность использования генов *NLGNX/Y* для установления пола человека.

Несмотря на довольно высокую гомологию кодирующих областей генов *NLGNX/Y*, составляющую 96,9% [Maxeiner et al., 2019], между ними выявляются и различающиеся участки. Так, нетранслируемые области первого экзона содержат большое число нуклеотидных замен, а также протяженную инсерцию у гена *NLGN4X*, обозначенную на рисунке 3.57 как (X)₁₆₁.



Рис. 3.57. Фрагменты нуклеотидной последовательности генов *NLGNX* и *NLGNY* и расположение праймеров, подобранных для установления половой принадлежности биоматериалов человека.

Нами были выбраны участки генов NLGNX и NLGNY, амплификация которых с помощью ПЦР обеспечивала бы однозначное определение пола индивида по его биоматериалу. Данные участки подобраны таким образом, что имеют полностью гомологичную нуклеотидную последовательность с одной стороны, и негомологичную – с другой (рис. 3.57). К указанным участкам были подобраны гендер-специфичные праймеры F-X (5'- AGTCTCTCCCAGGTCTACTGCTCC-3', длина 24 нт) и F-Y (5'-GCATTGGAGTTTTCGAAAGACT-3', длина 22 нт), а также общий праймер R-XY (5'-CAGAGGCGAGCCTGCAGA-3', длина 18 нт), которые сконструированы таким образом, чтобы получались короткие ПЦР-продукты разной длины: 59 и 46 п.о. для нуклеотидных последовательностей из X- и Y-хромосом соответственно (табл. 2.11, №№357-359). В результате мультиплексной ПЦР-амплификации ДНК с использованием данных праймеров должен нарабатываться один (для XX-индивидов) или два (для XY-индивидов) продукта ПЦР, что обусловливает наличие одного или двух пиков на кривых плавления и одной или двух полос ДНК на электрофоретическом геле, соответственно.

Система праймеров была апробирована на выборке ДНК, полученных от 50 человек (фенотипические мужчины и женщины), являющихся представителями разных

рас (европеоидной, монголоидной и негроидной) и национальностей. Праймеры обеспечили удовлетворительную специфичность и высокую чувствительность ПЦРамплификации, позволив уверенно обнаружить до 10³ копий ДНК-мишени в образце (рис. 3.58А). Для всех индивидов ПЦР-анализ обеспечивал характерный профиль кривых плавления: четкие пики с одной вершиной при 82,5°С или с дополнительным плечом (наложение двух пиков с максимумами при 78,0 и 82,5°С), соответствующие целевым продуктам ПЦР (рис. 3.58Б). На электрофореграммах наблюдались либо одна полоса размером 59 п.о., либо две полосы размером 59 и 46 п.о. (рис. 3.58А, вставка).



Рис. 3.58. Профили ПЦР-амплификации (А) и плавления образующихся ПЦР-продуктов (Б). Цифрами отмечены соответствующие профили и дорожки в электрофоретическом геле (вставка): 1, 3, 5 – ДНК фенотипического мужчины, 2, 4, 6 – ДНК фенотипической женщины, "K-" – образец отрицательного контроля; 1-4 – 10⁴ копий ДНК-мишени, 5 и 6 – 10^3 копий ДНК-мишени; 1, 2, 5, 6 – ДНК, не подвергнувшаяся воздействию ультразвука, 3 и 4 – ДНК, разрушенная ультразвуком.

Дополнительно были проведены эксперименты с образцами ДНК, подвергнутыми длительному (35 мин) УЗ-воздействию, взятыми как модель ДНК из разрушенного криминалистического материала. ПЦР-амплификация подобной ДНК также обеспечила высокую чувствительность анализа (рис. 3.58А, кривые 3 и 4). Полученные результаты показали отсутствие у взятых в исследование индивидов аномалий строения генов *NLGNX* и *NLGNY*. Новый полиморфный локус на основе генов *NLGNX* и *NLGNY* можно использовать при проведении судебно-медицинской экспертизы. Существенное различие в расположении данных локусов относительно ПАО, а также сочетание разных типов полиморфизма, с одной стороны, и возможность использования гендер-специфичных праймеров "в одной пробирке" (режим мультиплексной ПЦР), с другой, позволяет рекомендовать их в качестве альтернативного или дополнительного маркера при определении половой идентичности человека, в том числе в составе систем для ДНКрегистрации населения.

3.5.2. Метод сравнительной оценки статуса метилирования ДНК

Применимость УЗ-фрагментации ДНК с последующей ПЦР-амплификацией (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 (мужчины 25-35 лет). Образцы ДНК с концентрацией 30 нг/мкл (10⁴ копий мишени) обрабатывали УЗ в течение 2, 8 или 16 мин и использовали далее для проведения кПЦР-амплификации следующих локусов (промоторные области генов): GAPDH (ген глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы – GAPDH), IL2 (ген интерлейкина 2 – IL2), DNMT1 (ген ДНК-метилтрансферазы 1 – DNMT1), RASSF1 (ген члена семейства белков Ras1 – RASSF1), KEAP1 (ген kelch-подобного ECHассоциированного белка 1 - KEAP1), NFE2L2 (ген ядерного фактора – NFE2L2, или NRF2) и CDKN2A (ген ингибитора циклин-зависимой киназы – CDKN2A). GAPDH – типичный ген "домашнего хозяйства". DNMT1 кодирует ДНК-метилтрансферазу 1, непосредственно участвующую в метилировании ДНК in vivo [Hamidi et al., 2015]. Считается, что RASSF1 играет важную роль в онкогенезе [Liu et al., 2005]. KEAP1 и NFE2L2 представляют пару антагонистических генов, задействованных в ответе на окислительный и электрофильный стрессы, в том числе при онкологических заболеваниях [Chartoumpekis et al., 2015]. CDKN2A кодирует супрессоры опухолей p16 и p14arf. Для амплификации использовали праймеры, последовательность которых приведена в таблице 2.3 (№№61-84).

Известно, что геномы млекопитающих содержат сгруппированные динуклеотиды СрG (так называемые CpG-островки, CGI). Как правило, большинство CGI находятся преимущественно в промоторных областях генов и не метилированы, тогда как в остальной части генома динуклеотиды CpG метилированы [Rollins et al., 2006; Suzuki, Bird, 2008]. Ранее было показано, что метилирование ДНК происходит по краям CGI (т.е. в областях с более низкой плотностью CpG, которые находятся в непосредственной близости, но не в пределах CGI [Suzuki, Bird, 2008; Hamidi et al., 2015]), поэтому выбирали праймеры для амплификации коротких нуклеотидных последовательностей вблизи CGI или непосредственно в промоторной области. Для генов DNMT1, KEAP1, NFE2L2, RASSF1 и CDKN2A было выбрано по два локуса: R-локусы (относительно протяженные и GCбогатые) 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.

Значения N_{DNA} не позволяют также определять гипер- и гипометилированные состояния. Наиболее показательные результаты были получены для ДНК после 2-минутной УЗобработки (рис. 3.59).



Рис. 3.59. Анализ метилирования промоторных областей ряда генов человека (10⁴ 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, обусловленной полным отсутствием CpG в этом локусе. Более высокий уровень метилирования обнаружен для DNMT1 в Jurkat по сравнению с контролем. Типичное для онкопатологии повышение уровня метилирования CpG было найдено также для локусов RASSF1 и CDKN2A. Антагонистический характер метилирования наблюдался для пары KEAP1-NFE2L2. Так, уровень метилирования KEAP1, в отличие от NFE2L2, повышен для Jurkat по сравнению с контролем.

Для верификации полученных данных был определен статус метилирования всех локусов, за исключением IL2, методом бисульфитного секвенирования (рис. 3.60). Для всех R-локусов (DNMT1-R, KEAP1-R, NFE2L2-R, RASSF1-R и CDKN2A-R) амплификация конвертированной бисульфитом натрия ДНК не увенчалась успехом.



Рис. 3.60. Данные бисульфитного секвенирования. Черными кружками обозначены метилированные CpG, белыми – неметилированные CpG. В качестве контроля использовали ДНК из лейкоцитов здоровых индивидов.

Эти локусы протяженнее и более GC-богатые по сравнению с Р-локусами, и, повидимому, повышенное содержание цитозинов вызывает эффективную деградацию ДНК при ее обработке бисульфитом натрия. В то же время Р-локусы, содержащие меньше цитозинов, были успешно амплифицированы и секвенированы. Для GAPDH P не было обнаружено сайтов метилирования (белые кружки на рис. 3.60), что, по-видимому, 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 КЕАРІ-Р только четыре специфических сайта (положения СрG-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 СрG в локусе КЕАР1-Р была достоверно повышена в ДНК из Jurkat, что коррелировало со снижением количества амплифицируемых ДНК-мишеней. Такое же сайт-специфическое метилирование было обнаружено для RASSF1-P (положения CpG 5, 7, 9-12) и CDKN2A-P (положения CpG 2, 4 и 5). Данные секвенирования подтвердили результаты, полученные с использованием метода УФА.

Дополнительную верификацию собственных результатов проводили путем оценки статуса метилирования четырех генов с помощью технологии MethylScreen (MST) [Holemon et al., 2007], концептуально схожей с методом УФА, поскольку она включает сравнительную ПЦР-амплификацию фрагментированной ДНК. Согласно MST, ДНК расщепляется метилчувствительными и метилзависимыми рестриктазами и далее проводится ПЦР. Использовали метилзависимую эндонуклеазу рестрикции McrBC (сайт рестрикции 5'-PuC^{Me}-3') и метилчувствительную эндонуклеазу рестрикции HhaI (сайт рестрикции 5'-GCGC-3'). Амплификации подвергали более протяженные (по сравнению с УФА) области генома с помощью дополнительных праймеров (табл. 2.3, №№85-90). Были проанализированы только следующие четыре геномных локуса (локусы MST), содержащие сайты рестрикции эндонуклеазы HhaI и включающие последовательности Рлокусов: DNMT1-MST (10 сайтов GCGC, 59 CpG), KEAP1-MST (20 GCGC, 92 CpG), NFE2L2-MST (9 GCGC, 73 CpG) и RASSF1-MST (14 GCGC, 83 CpG). Результаты, полученные с помощью УФА и MST, удовлетворительно коррелировали между собой (табл. 3.24). Например, для RASSF1 пониженное значение N_{DNA} для ДНК из Jurkat соответствовало повышенному уровню метилирования, обнаруженному с помощью MST. Только для NFE2L2 были получены неопределенные результаты, что связано, вероятно, с отсутствием сайтов 5'-GCGC-3' в этом локусе и, соответственно, невозможностью ферментативного расщепления ДНК.

05 7 2701	DNMT1		KEAP1		NFE	2L2	RASSF1		
ооразец	MST, %	УФА, lgN _{DNA}							
Jurkat	55,3±6,2	3,7±0,1	34,8±4,6	3,6±0,1	27,6±5,1	4,0±0,0	64,7±9,2	3,7±0,1	
контроль	74,1±8,5	3,4±0,1	1,3±0,5	3,7±0,1	11,0±2,2	3,9±0,1	5,8±2,7	4,2±0,1	

Таблица 3.24. Значения уровня метилирования ДНК, полученные с помощью технологии MST и метода УФА.

Таким образом, с помощью метода УФА возможно проведение сравнительной оценки статуса метилирования ДНК. Умеренный размер амплифицируемой области (около 150-250 п.о.) и средняя плотность расположения динуклеотидов CpG – необходимые требования к подбору праймеров, применимых для анализа метилирования с помощью УФА. УЗ-обработку ДНК следует проводить в течение короткого времени, поскольку максимальная разница в количестве амплифицируемых мишеней между метилированными и неметилированными последовательностями достигается в начальный период воздействия. Метод УФА может быть использован для сравнительного анализа метилирования ДНК, когда нет необходимости обнаруживать метилирование конкретных CpG динуклеотидов, например, при оценке воздействия стресса или патологических, возрастных и тканеспецифических изменений. Метод прост в исполнении (может использоваться любым специалистом, владеющим ПЦР), доступен (не нужны дорогостоящие реагенты) и не затратен по времени (проводятся только краткое УЗ-облучение препарата ДНК и далее обычная ПЦР в реальном времени).

3.5.3. Способ циклизации одноцепочечных ДНК

Широкое применение на практике метода АКК сдерживается использованием в этой реакции в качестве матриц кольцевых структур, получаемых из С-проб, лишь частично гомологичных анализируемой НК, вследствие чего необходимо подбирать конкретные С-пробы под каждую мишень. Было бы удобным получать КМ напрямую из анализируемой НК и вовлекать ее в реакцию АКК с последующей детекцией результатов.

Нами предлагается получать одноцепочечные ДНК-кольца с помощью Т4 РНКлигазы, приводящей наряду с линейными продуктами к образованию небольшого количества кольцевых структур [Silber et al., 1972; Snopek et al., 1976]. Данный фермент способен к внутри- и межмолекулярному лигированию как РНК, так и одно- и двуцепочечных ДНК, в том числе нематричному, что позволяет отказаться от использования "поддерживающей" матрицы и сразу вести циклизацию анализируемой НК [Uhlenbeck, Gimport, 1982]. Несмотря на то, что образование ДНК-колец под действием Т4 РНК-лигазы было показано около 40 лет назад, данные о применении этого феномена для совершенствования метода АКК отсутствуют. Лишь в одной работе описан способ анализа микроРНК, основанный на их циклизации с помощью Т4 РНК-лигазы и последующей ТКК [Kumar et al., 2011].

С целью оценки возможности использования Т4 РНК-лигазы для получения одноцепочечных ДНК-колец получали кольцевые ДНК для последующей АКК в варианте рамификации с двумя праймерами. В качестве предшественников КМ были взяты три олигонуклеотида: TL1, TL2 и TL3 длиной 30, 50 и 70 нт, соответственно, и праймеры к ним (табл. 2.9, №№ 335-344). Каждую из этих линейных матриц подвергали нематричному лигированию (циклизации) под действием Т4 РНК-лигазы и далее проводили рамификацию. Положительный результат дала рамификация только с продуктом лигирования олигонуклеотида TL2, поэтому дальнейшие эксперименты вели с этой матрицей. Возможно, TL1 также приводит к кольцевому продукту; имеются данные, что наиболее эффективной является циклизация малых олигонуклеотидов [Sugino et al., 1977; Kaufmann et al., 1974]. Но вероятно, ДНК-полимеразы Bst exo⁻ и Vent exo⁻, использованные для проведения АКК, не способны вести полимеризацию цепей на небольших кольцевых матрицах в силу стерических затруднений.

Для Bst exo⁻ рамификация проводилась только в изотермическом режиме, а для Vent exo⁻ – и в изотермическом режиме, и в режиме термоциклирования. Для всех трех температурных режимов проведения реакции наблюдалось образование характерных конкатемерных продуктов, но для Vent exo⁻ эффективность их наработки была ниже, вероятно, за счет более слабой цепь-вытесняющей активности, поэтому далее использовали только Bst exo-.

Ранее было показано, что внесение полиэтиленгликоля (ПЭГ) в лигазную смесь существенно изменяет соотношение продуктов лигирования под действием Т4 РНКлигазы в сторону увеличения количества кольцевых продуктов [Harrison, Zimmerman, 1984]. Определение концентрации ПЭГ 4000, обеспечивающей наибольший выход кольцевых ДНК, проводили денситометрией полос в гелях, полученных после АКК с соответствующими матрицами. Оказалось, что оптимальное содержание ПЭГ 4000 для использованной нами модельной системы составляет 5-10% (рис. 3.61А). В последующих экспериментах циклизацию проводили в условиях максимального выхода ДНК-колец.

Несмотря на успешное протекание рамификации в начальных экспериментах, оставался неясным вопрос о чувствительности реакции. Для лигирования брали 10^6 молекул олигонуклеотида TL2 на 1 мкл реакционной смеси. Однако ферментативные процессы не протекают со 100%-ной эффективностью, поэтому очевидно, что после фосфорилирования, лигирования и экзонуклеазной обработки и с учетом разбавления в опытных образцах оставалось ничтожное количество кольцевых ДНК. Тем не менее, с помощью рамификации в реальном времени была проведена грубая оценка количества получаемых ДНК-колец. Для этого препарат после лигирования (исходная концентрация TL2 составляла 10^6 молекул/мкл) последовательно разбавляли, получая образцы с условным содержанием 10^4 , 10^2 и 10^1 молекул TL2 в 1 мкл раствора. При этом очевидно, что реальное количество кольцевых ДНК меньше указанных величин.



Рис. 3.61. Влияние состава реакционной смеси на протекание рамификации. (А) Оценка оптимального содержания ПЭГ 4000 в лигазной смеси при получении ДНК-кольцевых структур для TL2. (Б) Рамификация в реальном времени (образцы представлены в двух повторах). Кривые: 1-8 – образцы, содержащие продукт циклизации TL2 (кривые 1 и 2 – 10^6 молекул TL2, 3 и 4 – 10^4 , 5 и 6 – 10^2 , 7 и 8 – 10^1); 9 и 10 – образцы, содержащие 10^6 молекул исходного (линейного) TL2; 11 и 12 – отрицательный контроль (отсутствие TL2); 13 и 14 – отрицательный контроль (отсутствие праймеров).

Количественная рамификация дала удовлетворительный результат для образца, полученного 100-кратным разведением (рис. 3.61Б, кривые 3 и 4). Эта величина оказалась пределом чувствительности, поскольку кривые, соответствующие образцам с бо́льшим разведением (≥10000[×]), имеют различающиеся величины пороговых циклов (рис. 3.61Б, кривые 5 и 6). Тем не менее, уверенный подъем кривых 5 и 6 с эффективностью, равной таковой для кривых 1-4, свидетельствует о наличии в образцах КМ. Разница в величине пороговых циклов для кривых 5 и 6 обусловлена, вероятно, тем, что содержание ДНК-колец достигало единичных копий (5-10 копий). Образец, соответствующий кривой 7, содержал, по-видимому, 1-3 ДНК-кольца, в то время как в парном ему образце (кривая 8)

их не оказалось вовсе в силу случайности распределения единичных молекул между аликвотами. Следовательно, эффективность циклизации TL2 в условиях проведенной реакции была относительно низкой.

Абсолютное количество кольцевых продуктов теоретически можно увеличить, если брать в реакцию лигирования бо́льшую концентрацию исходных молекул. Но в этом случае выход ДНК-колец будет снижаться в силу предпочтительности межмолекулярного лигирования. Кроме того, при амплификации образцов тотальной ДНК какого-либо высшего организма нельзя взять больше 10⁵ копий мишени. В то же время малое количество лигируемых молекул (10³-10⁴) может не обеспечить получения достаточного для рамификации количества КМ.

Наиболее интригующим явилось изучение применимости способа циклизации для получения КМ из дцДНК. Для этого тотальную ДНК человека фрагментировали с помощью УЗ таким образом, чтобы наибольшая часть фрагментов была длиной около 150 п.о. Но нельзя исключать, что при этом в препарате присутствуют фрагменты ДНК и меньшего размера. Качество фрагментации оценивали электрофорезом в агарозном геле. Далее разрушенную таким образом ДНК дефосфорилировали, затем фосфорилировали, денатурировали в присутствии формамида и сразу проводили лигирование (рис. 3.62А). Затем половину объема реакционных смесей (содержащих формамид и буферные компоненты киназной и лигазной систем) подвергали очистке высаживанием ДНК 96%ным этанолом, вторую половину брали в реакцию рамификации без очистки. При проведении рамификации в качестве ОК брали образцы, полученные согласно описанной выше последовательности действий, но не содержавшие ДНК (рис. 3.62Б, дорожка 1).

В отличие от праймеров модельной системы (Pr 11/Pr 12 и Pr 21/Pr 22), комплементарных концевым участкам матриц, в данном случае использовали праймеры относительно небольшой длины Pr 31 и Pr 32, располагающиеся "встык" друг к другу. Подобное расположение обеспечивает бо́льшую вероятность отжига ключевых, 3'-концевых участков праймеров на ДНК-матрице, так как, в отличие от синтетического олигонуклеотида, для препарата, получаемого из дцДНК, размер и нуклеотидная последовательность образующихся КМ случайны и нельзя исключать варианта, при котором праймеры (один или оба) не будут полностью отжигаться на КМ. Для проведения рамификации был выбран уникальный участок нуклеотидной последовательности в геноме *H.sapiens* рядом с rs2312154. При использовании в рамификации неочищенного препарата ДНК реакция не протекала, вероятно, из-за наличия в реакционных смесях формамида, обладающего денатурирующими свойствами (рис. 3.62Б, дорожка 3). Из электрофореграммы (дорожка 4) следует, что длина мажорных конкатемеров изменяется с

шагом около 37-39 нт. Неожиданным оказалось отсутствие значительного расплывания полос, соответствующих конкатемерам разного размера.



Рис. 3.62. Схема получения кольцевых матриц из дцДНК (А) и результаты рамификации с препаратом, полученным циклизацией дцДНК (Б): дорожки: 1 – отрицательный контроль (отсутствие ДНК), 2 – образец, содержавший исходную ДНК, 3 – образец, содержавший неочищенный препарат лигирования, 4 – образец, содержавший очищенный препарат лигирования, М – маркер pUC19/MspI.

Учитывая низкие эффективность циклизации и содержание ДНК (30 нг, или 10⁴ копий мишени), а также высокую чувствительность рамификации, можно предположить, что отсутствие расплывания полос является результатом амплификации единичной КМ или, что гораздо менее вероятно, нескольких КМ одинакового размера. Несомненно, количество образовавшихся после лигирования ДНК-колец было достаточно велико, но использованные праймеры Pr 31 и Pr 32, имеющие суммарную длину 32 нт, смогли амплифицировать только близкие по размеру кольца.

Таким образом, был предложен новый способ получения кольцевых ДНК, заключающийся в циклизации исследуемой НК с помощью РНК-лигазы фага Т4 в ходе внутримолекулярного нематричного лигирования. Образующиеся ДНК-кольца способны выступать матрицами в АКК. Максимальный выход продуктов циклизации наблюдается при 5-10%-ном содержании полиэтиленгликоля 4000. Применимость описанного способа продемонстрирована на искусственно фрагментированной дцДНК, что позволяет рекомендовать его для анализа, например, разрушенной ДНК.
3.5.4. Способ типирования микродиплотипов

В последнее десятилетие в ДНК-криминалистике значительное внимание уделяется новому типу полиморфных локусов – микрогаплотипам [Kidd et al., 2013]. К ним относят последовательности ДНК в геноме размером несколько сотен пар оснований (обычно 150-200 п.о.), несущие определенное количество SNP. Микрогаплотипы рассматриваются как перспективные ДНК-маркеры для идентификации человека. При их анализе требуется сопоставление данных типирования микрогаплотипов с обеих парных хромосом, в связи с чем, на наш взгляд, такие локусы правильнее называть микродиплотипами.

полиморфизма микродиплотипов В ДНК-криминалистики Анализ целях проводится в настоящее время только в исследовательских целях. Для этого используются технологии массивного параллельного секвенирования, что ограничивает широкое практическое использование данного типа ДНК-полиморфизма. Предложены различные панели локусов на основе микродиплотипов, применимость которых показана, как правило, на отдельных популяциях [Pakstis et al., 2012; Hiroaki et al., 2015; Kidd et al., 2017]. Растущее внимание к микродиплотипам привело к необходимости выработки критериев для их выбора в геноме человека. К.Kidd предложил относить к ним участки ДНК размером около 200 п.н., содержащие не менее трех высокополиморфных SNP [Kidd, 2015]. Помимо высокой степени полиморфизма и низкой частоты мутаций, важным преимуществом микродиплотипов как криминалистических маркеров является возможность анализа образцов, содержащих смеси ДНК и разрушенные ДНК [Tan et al., 2017].

Нами разработан новый способ типирования микродиплотипов, принципиальная схема которого представлена на рисунке 3.63. Сначала проводят фрагментацию анализируемой дцДНК ультразвуком до фрагментов размером около 200 п.о., затем в полученный препарат добавляют буферы ДНК-полимеразы Т4, ДНК-лигазы Т4 и предварительно фосфорилированную С-пробу, смесь нагревают и постепенно охлаждают. Далее проводят одновременно элонгацию (заполнение бреши между отожженными 5'- и 3'-концами С-пробы) и циклизацию С-пробы, добавляя ДНК-полимеразу Т4 и ДНК-лигазу Т4. На последующем этапе разрушают все линейные ДНК с помощью экзонуклеазы Ехо I. Полученный препарат кольцевой ДНК используют далее для проведения рамификации.



Рис. 3.63. Молекулярная схема технологии типирования микродиплотипов с помощью рамификации (описание в тексте). N1, N2, N3 – полиморфные нуклеотиды, Р – фосфат.

Предлагаемый способ типирования был апробирован на мишени из генома человека (хромосома 20), последовательность которой представлена на рис. 3.64.

33 333 660	33 333 670	33 333 680	33 333 690	33 333 700	33 333 710	33 333 720	33.3
100,000,000	00,000,070				00,000,720	00,000,720	00,0
TTGACCTAGA	GGGCAGGACC	ACCCTGCACA	T G A A C T T G C A .	AAGTCTCCCA	GCCCTTGGTG	TGCATATATG	AC
AACTGGATCT	сссбтсстбб	TGGGACGTGT	ACTTGAACGT	TTCAGAGGGT	C G G G A A C C A C .	A C G T A T A T A C	ΤG
BI Homo sapiens 2 ack data found in this range	Annotation Releas	∍ 109.20201120	14				
NPs, dbSNP b154 v	72		14				
		rs750560947 🗰 C/A/T rs56374924 🗰 A/C/(rs1275109966 💻	A/G	rs	929389571 💻 A/G rs1437957512	2 💼
T/C		rs136	6503593 💻 C/T			rs60	5782
591 💳 G/A		r	\$1600679966 🧮 T/C			rs910	3807
73536 💻 A/C/T							
3548790 🧰 C/T							

Рис. 3.64. Участок последовательности в геноме человека, выбранной в качестве модельного микродиплотипа для типирования.

Последовательность выбранного микродиплотипа включала следующие пять SNP rs750560947, rs56374924, rs1366503593, rs1600679966 и rs1275109966, аннотированных в БД dbSNP NCBI на момент начала работы. Данные SNP расположены на участке длиной 14 п.н., фланкированном участками без SNP протяженностью чуть более 20 нт, что достаточно для уверенного отжига на них концов С-пробы. К указанной последовательности была сконструирована С-проба rsMD-С размером 58 нт и соответствующие праймеры к ней rsMD-1 и rsMD-2 (табл. 2.11, №№360-362). С-проба была сконструирована таким образом, чтобы праймеры были гомологичны участкам, некомплементарным анализируемой ДНК. Это обеспечивает два преимущества: 1) можно

подобрать праймеры с последовательностью, которая исключает вероятность фальшпраймирования с какой-либо известной геномной ДНК, 2) можно конструировать несколько С-проб с одинаковой внутренней последовательностью, гомологичной паре универсальных праймеров, и различающихся только 5'- и 3'-концевыми мотивами, что обеспечит одновременный (мультиплексный) анализ нескольких микродиплотипов с помощью только одной пары праймеров. Длина праймеров rsMD-1 и rsMD-2 была намеренно задана относительно короткой, суммарно равной 37 нт, для исключения возможного протекания MM в случае образования каких-либо гетеродимерных структур.

Для отработки подхода было взято 5 образцов ДНК разных индивидов. ДНК фрагментировали под действием УЗ в режиме "high" в течение 30 мин, далее проводили отжиг пробы rsMD-C на матрице, достраивание цепи и циклизацию. Заполнение бреши осуществляли с помощью ДНК-полимеразы Т4, не обладающей 5'→3'-экзонуклеазной активностью. После удаления всех линейных ДНК в ходе экзонуклеазной обработки получали препараты, содержавшие кольцевые матрицы, которые использовали далее для проведения рамификации под действием полимеразы Bst LF (реакцию вели по стандартному протоколу изотермической амплификации). Результаты рамификации оценивали с помощью гель-электрофореза, показавшего наработку конкатемерных продуктов в образцах, содержавших КМ. Образцы после рамификации, содержавшие конкатемерные продукты, далее направляли на секвенирование в приборе MiSeq. В части полученных ридов нуклеотидные последовательности включали искомый фрагмент длиной 14 нт, что свидетельствовало об успешной циклизации удлиненной пробы rsMD-C и последующей ее амплификации (рис. 3.65).

TTGACCTAGAGG <mark>GCAGGACCACCCTG</mark> CACATGAACTT *****	<mark>GCAAAGTCTCCCAGCCCTTG</mark> GTGTGCATATATG ******	верхняя цепь анализируемой ДНК
AACTGGATCTCCCGTCCTGGTGGGACGTGTACTTGAA	CGTTTCAGAGGGTCGGGAACCACACGTATATAC *****	нижняя цепь анализируемой ДНК
TCTGTGAGGGTCGT <mark>GCAGGACCACCCTG</mark>	AAGTCTCCCAGCCCTTGCGTGGTGCGTGAG	участки отжига С-пробы
индивид МД1 тстатдададатсат <mark>ссаддассассста-</mark> асатдаастта тстатдададатсат <mark>ссаддассассста-</mark> асатдаастта тстатдададатсат <mark>ссаддассассста-</mark> асатдаастта тстатдададатсат <mark>ссаддассассста-</mark> асатдаастта	GCAAAGTCTCCCAGCCCTTGCGTGGTGCGTGAG GCAAAGTCTCCCAGCCCTTGCGTGGTGCGTGAG GCAAAGTCTCCCAGCCCTTGCGTGGTGCGTGAG GCAAAGTCTCCCAGCCCTTGCGTGGTGCGTGAG	
индивид МД2 тстатаадаатсат <mark>ссаадаасстсаа</mark> асатдаастт тстатаадаатсат <mark>ссаадаассассстаа</mark> асатдаастт тстатаадаатсат <mark>ссаадаассассстаа</mark> асатдаастт	GCAAAGTCTCCCAGCCCTTGCGTGGTGCGTGAG GCAAAGTCTCCCAGCCCTTGCGTGGTGCGTGAG GCAAAGTCTCCCAGCCCTTGCGTGGTGCGTGAG	

Рис. 3.65. Примеры нуклеотидной последовательности конкатемерных продуктов, полученных при типировании модельного микродиплотипа у двух разных индивидов. Полиморфные нуклеотиды выделены красным шрифтом и красной заливкой, идентичные олигонуклеотидные мотивы – цветной заливкой.

Существенных различий в структуре полиморфного фрагмента ДНК между разными индивидами обнаружено не было ввиду чрезвычайно низких частот минорных аллелей. Лишь для одного индивида (МД1) обнаружена делеция в позиции rs750560947. Таким образом, получены предварительные данные, свидетельствующие о принципиальной возможности типирования микродиплотипов с помощью разработанной схемы анализа, однако требуется дальнейшая отработка предлагаемой технологии.

3.5.5. Обнаружение НК-мишеней с помощью мультимеризации

Однозначность протекания MM при определенных условиях обусловливает возможность использования данной реакции для анализа специфических HK.

3.5.5.1. Метод оценки уровня микроРНК

МикроРНК (миРНК) представляют собой класс малых некодирующих РНК, играющих ключевую роль в регуляции сигнальных путей и реакций живых организмов на стресс [Xiao, 2022]. В последнее десятилетие значительное внимание уделяется изучению миРНК таких важных организмов, как сельскохозяйственные культуры. Так, для Triticeae идентифицировано более 200 семейств миРНК [Alptekin et al., 2017]. Концентрация миРНК в биологических тканях варьирует в наномолярном диапазоне, поэтому для оценки содержания данного типа НК требуется амплификация. Зрелые миРНК представляют собой небольшие молекулы короткие одноцепочечные _ рибоолигонуклеотиды, обнаружение которых с высокой достоверностью с помощью классической ПЦР затруднено. В то же время, малый размер обеспечивает более высокую стабильность миРНК по сравнению с другими РНК. Хотя размер и нуклеотидная последовательность миРНК четко детерминированы, затруднения при проведении амплификации обусловлены сложностью конструирования подходящей праймерной системы.

Нами разработан новый подход к обнаружению зрелых миРНК, основанный на ММ. В случае миРНК молекулярная схема процесса будет иметь вид, представленный на рисунке 3.66. На первом этапе фосфорилированную миРНК лигируют с адаптором Adp в ходе нематричного лигирования с использованием РНК-лигазы T4, в результате чего получается химерный ДНК/РНК-продукт. Для обеспечения наибольшей эффективности ММ размер Adp подобран таким образом, чтобы длина химерного продукта составила 51 нт. Праймер Pr отжигается на PHK-части химеры и удлиняется с помощью ДНК-полимеразы с последующим образованием первичного ампликона (1L) (этапы 2 и 3). На

5'-конце адаптора находится олигонуклеотидный мотив, идентичный мотиву на 3'-конце миРНК, введенный для облегчения "дыхания" цепей (этап 4) и инициации образования комплекса (этап 5). Инициирующий комплекс приводит к первому мультимерному продукту 2L (стадии 6 и 7), а повторение стадий (5)-(i) – к смеси мультимерных продуктов разной длины (nL). Аdр служит вторым праймером при амплификации. Генерация дуплексов длиной >2L переводит реакцию в экспоненциальный режим за счет увеличения количества мест отжига для обоих праймеров.



Рис. 3.66. Схема обнаружения миРНК с помощью мультимеризации (L – длина мономерного звена, (1)-(*i*) – этапы реакции) (описание в тексте).

ММ начинается с образования инициаторного комплекса, но вероятность этого события очень мала. Поэтому накопление детектируемого количества продуктов ММ зависит от концентрации мишени и условий реакции. Для повышения скорости и эффективности ММ соблюдались 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[×]), уменьшенное количество SGI и 1 мМ ДТТ.

Применимость ММ для обнаружения РНК-мишеней сначала изучали на синтетических миРНК. Для этого химически синтезировали пять наиболее изученных миРНК растений пшеницы *Triticum aestivum*, а также адаптор Adp и праймер Pr, комплементарный Tae-miR159 (табл. 3.25 или табл. 2.10, №№345-356).

Шифр	Посненовательность $5^2 \rightarrow 3^2$	Размер,
шифр		HT
Tae-miR159*	uuuggauugaagggagcucug**	21
Tae-miR5050	uugaacgaccucaccaugucg	21
Tae-miR9662a	uugaacaucccagagccaccg	21
Tae-miR398-3p	uguguucucaggucgccccg	21
Tae-miR167c-5p	ugaagcugccagcaugaucugc	22
Pr-159	CAGAGCTCCCTTCAATCCAAA	21
Pr-5050	CGACATGGTGAGGTCGTTCAA	21
Pr-9662a	CGGTGGCTCTGGGATGTTCAA	21
Pr-398-3p	CGGGGGGCGACCTGAGAACACA	21
Pr-167c-5p	GCAGATCATGCTGGCAGCTTCA	22
Adp	CTCTGACGAGAACTTGACTTCACTATGACT	30
	CTCTGACGAGAACTTGACTTCACTATGACTATGGCT	
RTQ	GGCTAGTTACTTGATCCCTAGTCCTTTTTTTTTTTTTT	85
	TTTTTTTTTT	

Таблица 3.25. Олигонуклеотиды, использованные для анализа микроРНК.

* последовательности миРНК взяты из базы данных миРНК https://www.mirbase.org. ** заглавные буквы - дезоксирибонуклеотиды, прописные буквы - рибонуклеотиды.

Тае-miR159 относится к миPHK, играющим важную роль в ответе растений на биотические и абиотические стрессы [Alptekin et al., 2017; Millar et al., 2019]. Молекулы миPHK идеально подходят для проведения MM благодаря малому конечному размеру, что позволяет генерировать HK-структуры, обеспечивающие эффективную MM. Все синтетические миPHK предварительно фосфорилировали, далее лигировали с Adp и проводили MM. Значения порогового времени Tt, полученные для образцов разного типа, свидетельствовали о высокой специфичности обнаружения миPHK-мишени, поскольку наиболее быстрая амплификация наблюдалась для образцов, содержавших Tae-miR159 (рис. 3.67A, кривая 1). Фосфорилирование миPHK немного ускоряло реакцию (рис. 3.67A, кривая 1а). Значения Tt для специфической амплификации находились в пределах 30-50 мин, а для образцов контроля составили >80 мин (рис. 3.67A, кривые 2-5 и NTC). Гельэлектрофоретический анализ показал наличие мультимерных продуктов ожидаемой

длины (~50 п.о.) только для образцов, содержавших специфическую мишень (рис. 3.67Б, дорожки 1 и 1а). Для контрольных образцов накопления характерных мультимерных продуктов не наблюдалось (рис. 3.67Б, дорожки 2-5 и NTC).



Рис. 3.67. Кривые амплификации (А) и электрофоретический анализ результатов амплификации (Б), полученных для синтетических миРНК (10⁸ копий мишени на реакцию): 1 – Тае-miR159, 1а – фосфорилированная Тае-miR159, 2 – Тае-miR5050, 3 – Тае-miR9662a, 4 – Тае -miR398-3p, 5 – Тае-miR167с-5p, NTC – отрицательный контроль (ММ проведена в условиях, способствующих максимальной эффективности реакции).

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. 3.68А). 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. Калибровочные образцы, содержавшие $1,5 \cdot 10^7 \cdot 1,0 \cdot 10^9$ копий фосфорилированной Tae-miR159, получали серийными разведениями исходного раствора. Эксперименты позволили определить содержание Tae-miR159 во всех образцах растений пшеницы (рис. 3.68В). Было обнаружено примерно 3-кратное увеличение количества Tae-miR159 для инфицированных растений (рис. 3.68Б), что свидетельствует об участии этой микроРНК в ответ на заражение *S.nodorum*.



Рис. 3.68. Результаты количественного определения Тае-miR159. (А) Реакция растений пшеницы сортов Омская 35 (устойчивый) и Казахстанская 10 (чувствительный) на заражение *S.nodorum* (после 6 дней инокуляции). (Б) Общее содержание Tae-miR159 по данным мультимеризации и ПЦР-анализа. (В) Количественная оценка Tae-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 Tae-miR159 с помощью мультимеризации. (Д) Количественная оценка Tae-miR159 с помощью ПЦР: 1, 2 – Омская 35; 3, 4 – Казахстанская; 1, 3 – контрольные растения (красные кривые). (Г) Калибровочный график при определении Tae-miR159 с помощью мультимеризации. (Д) Количественная оценка Tae-miR159 с помощью ПЦР: 1, 2 – Омская 35; 3, 4 – Казахстанская; 1, 3 – контрольные растения (зеленые кривые). (Е) Калибровочный график при определении Тае-miR159 с помощью ПЦР. Для обеих реакций амплификации калибровочные образцы (синие кривые) содержали синтетическую фосфорилированную Tae-miR159 в количестве 1,5·10⁷, 6,0·10⁷, 2,5·10⁸, 1,0·10⁹ копий/мкл.

Значения Tt на калибровочной кривой не демонстрировали той линейной зависимости, которая характерна для количественной ПЦР: дисперсия значений Tt в

пределах повторов несколько возрастала с уменьшением числа копий мишени (рис. 3.68Γ). Это относительное отклонение от нелинейности объясняется особенностью MM. Как было сказано выше, начало MM является случайным событием, и по мере уменьшения количества копий мишени требуется больше времени для запуска реакции, что обусловливает бо́льшую разницу в начале ЭСР для повторов. Кроме того, эффективность реакции (Е), найденная по формуле $E=(10^{-1/\alpha}-1)*100\%$, где α – тангенс угла наклона прямой калибровочной зависимости, оказалась низкой, что обусловлено, очевидно, ее особенностями. Тем не менее, MM 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 Tae-miR159 оценивали также методом ПЦР, как описано в [Gupta et al., 2012]. Для этого методика ПЦР-амплификации была несколько модифицирована путем исключения стадии обратной транскрипции и использования ДНК-полимеразы Hemo KlenTaq (рис. 3.68Д). Для сравнения находили эффективность реакции по приведенной выше формуле (рис. 3.68Е). Она оказалась неожиданно малой для ПЦР, что объясняется, возможно, отличиями использованной в данном случае молекулярной системы: полиаденированная миРНК в качестве матрицы и удлиненная проба RTQ в качестве одного из праймеров. 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. 3.68Б).

Таким образом, предложен способ определения уровня миРНК, основанный на мультимеризации и не требующий использования РНК-зависимых ДНК-полимераз. Молекулярная основа предлагаемого подхода подразумевает вовлечение в амплификацию молекул только зрелых миРНК. Способ может быть использован как альтернатива существующим методам.

3.5.5.2. Способ обнаружения вирусных РНК

Амплификация любой РНК начинается с синтеза ее ДНК-копии (кДНК) в ходе реакции обратной транскрипции, которую обычно проводят до амплификации с помощью специального фермента (обратной транскриптазы) при относительно низкой температуре. Однако представляется удобным амплифицировать РНК без проведения отдельного этапа обратной транскрипции, т.е. с использованием одного фермента.

Однозначное протекание MM при определенных условиях позволяет использовать ее для обнаружения HK-мишеней. Так, если сконструировать пару мишень-специфичных сближенных праймеров, можно ожидать успешного протекания амплификации PHK

посредством ММ, как показано на рис. 3.69. На первой стадии один из праймеров (обозначен как R) отжигается на цепи РНК и удлиняется ДНК-полимеразой, обладающей обратно-транскриптазной активностью (здесь использовали ДНК-полимеразу Bst 3.0), в результате чего образуется двуцепочечный ДНК/РНК-гетеродуплекс. За счёт "дыхания" цепей появляется возможность отжига второго праймера (F) на синтезированной цепи кДНК, что приводит к ампликону размером 1L (этапы 2 и 3). Праймеры F и R имеют 5'-концевые последовательности, не гомологичные РНК-мишени, но комплементарные друг другу. Они способствуют повышению эффективности "дыхания" ДНК, облегчают образование инициаторного комплекса (Ini, шаг 4) и обеспечивают далее накопление мультимерных продуктов (шаги 5–i). Образование дуплексов длиной >2L переводит реакцию в экспоненциальный режим за счёт увеличения количества мест отжига для обоих праймеров. Молекулы РНК оптимальны для запуска ММ, поскольку являются одноцепочечными и обеспечивают лёгкий отжиг первого (R) праймера.



Рис. 3.69. Схема обнаружения РНК-мишени с помощью мультимеризации. F и R – праймеры, *Ini* – инициаторный комплекс, L – длина мономерного участка (повтора) двуцепочечной ДНК, (1)-(*i*) – этапы реакции.

ММ начинается с образования *Ini*, однако вероятность данного события мала. Ранее было показано, что накопление детектируемого количества продуктов ММ начинается через 25-70 мин в зависимости от концентрации матрицы и условий реакции ("специфическая" MM). В отсутствие матрицы и димеров праймеров (т.е. для "качественных" праймеров) накопление продуктов возможно спустя 100 мин; в данном случае протекает "неспецифическая" MM. Наличие в реакционной смеси 10 мМ ДТТ повышает эффективность MM.

Для демонстрации возможностей предлагаемого способа обнаружения РНКмишеней сконструировали две модельные пары праймеров: обычная пара F-S1/R-S1 и праймеры с комплементарными четырехнуклеотидными 5'-концевыми мотивами (F-S2/R-S2) (табл. 3.26 или табл. 2.8., №№310-314). Влияние структуры праймеров на ММ оценивали 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 MM (Тt ~70 мин) по сравнению с F-S2/R-S2 (Tt ~50 мин) (рис. 3.70А, кривые 1 и 3 соответственно). Оказалось, что ММ протекает быстрее с синтетической РНК по сравнению со сбалансированным образцом Rmix(+) (рис. 3.70А, кривые 1 и 2, или 3 и 4). Это связано с конечной длиной олигорибонуклеотида Qt, обусловливающей оптимальное строение Ini, что способствует более раннему началу ММ. По сравнению с ПЦР, кривые ММ демонстрируют меньшую сходимость в повторах, увеличивающуюся с уменьшением числа копий мишени (рис. 3.70А, кривые 1, 2 и 4).

Таблица 3.26.	Олигонуклеотиды,	использованные	для обнаруже	ния РНК кс	ронавируса
SARS-CoV-2.					

Шифр	Послеловательность, 5'→3'	Длина,
		HT
F-S1	GTTATCAGACTCAGACTAATTCTCCTC	27
R-S1	TTGACTAGCTACACTACGTGCCC	23
F-S2	GTCACAGACTCAGACTAATTCTCCTC*	26
R-S2	TGACTGACTAGCTACACTACGTGCCC	26
Qt	GTTaucagacucagacuaauucuccucggcgggcacguaguguagcuaguCAA**	53
F-N	TGACGCTTCAGCGTTCTTCGGAATGTC	27
R-N	GTCAAGGTGTGACTTCCATGCCAATG	23
F-O	TGACAAAAGTATTCTACACTCCAGGGAC	28
R-O	GTCAAAATGACTCTTACCAGTACCAGGTG	27

* жирным шрифтом выделены нуклеотиды, некомплементарные матрице.

 ^{**} дезоксирибоолигонуклеотиды записаны заглавными, рибоолигонуклеотиды строчными буквами.



Рис. 3.70. Протекание мультимеризации при использовании разных типов праймеров и PHK. (A) Влияние структуры праймеров и типа PHK-мишени на скорость мультимеризации: 1 – пара праймеров F-S1/R-S1 и синтетическая (Qt) PHK, 2 - F-S1/R-S1 и Rmix(+), 3 – пара праймеров F-S2/R-S2 и Qt, 4 - F-S2/R-S2 и Rmix(+), NTC-1 -отрицательный контроль для F-S1/R-S1, NTC-2 -отрицательный контроль для F-S2/R-S2. (Б) Кривые амплификации и электрофоретический анализ образцов: 1 - Rmix(+), 2 -Rmix(?), 3 - Rmix(-), 4 - Rmix(H), NTC -отрицательный контроль (данные для праймеров F-S2/R-S2; приведены только по одному из двух повторов).

Применимость ММ для обнаружения специфических РНК изучали на генетическом материале коронавируса SARS-CoV-2. Использовались установленные по результатам ПЦР-тестирования SARS-CoV-2-положительные, SARS-CoV-2-сомнительные, SARS-CoV-2-отрицательные образцы и образцы, полученные от здоровых индивидов. Как и в предыдущих модельных экспериментах, брали сбалансированные препараты Rmix. Для исключения влияния первичной структуры мишеней на эффективность ММ были сконструированы три пары праймеров для амплификации трёх разных генов коронавируса SARS-CoV-2 (табл. 3.26 или табл. 2.8., №№310-313, 315-318). Все праймеры содержали комплементарные (в пределах соответствующих пар) 5'-мотивы. Эксперименты не показали влияния первичной структуры мишени и праймеров на протекание MM, поэтому далее приводим результаты только для праймеров F-S2/R-S2.

При использовании препаратов группы 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 (рис. 3.70Б). Для Rmix(+) электрофоретический анализ показал образование характерных мультимерных продуктов – ДНК 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" MM (рис. 3.70Б).

Анализ данных, полученных при амплификации индивидуальных образцов, возможность дифференциации результатов "специфической" показал И "неспецифической" ММ. Значения Тt для SARS-CoV-2-положительных образцов находились в пределах 60-80 мин; в то же время для образцов из остальных групп значения Tt превышали 115 мин, что свидетельствует об отсутствии в них мишени (рис. 3.71). 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 содержавших РНК-мишень, не перекрывались, что позволило различить эти типы образцов и с высокой достоверностью утверждать о выявлении патогенной РНК. Таким образом, значение Tt ≈110 мин можно считать порогом клинической значимости (для использованных условий реакции).

Для оценки возможности количественного определения РНК коронавируса с помощью ММ использовали олигонуклеотид Qt. Калибровочные образцы, содержавшие 10³-10⁶ копий Qt, получали последовательными 10-кратными разведениями стокового раствора.



Рис. 3.71. Распределение значений Tt 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).

Следует отметить, что количество копий РНК-мишени в клинических образцах было неизвестно. Однако ранее сообщалось, что экстракты мазков COVID-19положительных пациентов содержат около 10^4 – 10^5 копий мишеней на 1 мкл раствора в зависимости от типа биоматериала, вирусной нагрузки, способа выделения РНК [Silva et al., 2022; Hernández-Vásquez et al., 2022; Tallmadge et al., 2022; Fujiya et al., 2022; Marando et al., 2022]. Эксперименты позволили определить содержание РНК в образцах от SARS-CoV-2-положительных пациентов. Для большинства образцов количество копий мишени составляло 10⁴-10⁵ (рис. 3.72А). В целом, полученные результаты коррелировали с данными ОТ-ПЦР, проводимой без специфических флуорогенных зондов, и обеспечивали чувствительность определения на уровне пикомолярных концентраций. Однако для образцов с очень низкой вирусной нагрузкой обнаружение с помощью ММ можно считать полуколичественным из-за невысокой сходимости Тt в повторах (рис. 3.72Б).

Для оценки применимости MM для анализа разрушенной PHK были приготовлены препараты PHK коронавируса путём многократного замораживания-оттаивания образца Rmix(+). Эксперименты в целом показали небольшое увеличение значений Tt с ростом количества циклов замораживания-оттаивания, что свидетельствует о снижении амплифицируемых PHK-мишеней (рис. 3.73). Неожиданно, но для Rmix, подвергнутого двухкратному замораживанию, наблюдалось незначительное снижение значения Tt, что, вероятно, связано с увеличением эффективности MM за счёт образования более коротких PHK-молекул. Увеличение количества циклов замораживания-оттаивания приводило к постепенному увеличению Tt, но даже для образца Rmix20 Tt не превысило 110 мин, что позволило с высокой достоверностью выявить целевую PHK. Таким образом, сближенное расположение праймеров позволяет обнаруживать разрушенную PHK и предъявлять менее строгие требования к транспортировке и хранению PHK-содержащих материалов.



Рис. 3.72. Чувствительность обнаружения вирусной РНК с помощью ММ (приведены данные для пары праймеров F-S2/R-S2). (А) Пример количественного анализа РНК коронавируса SARS-CoV-2 (пара праймеров F1/R1, логарифмическая шкала): кривые амплификации для Rmix(+) (тёмные кружки), Rmix(?) (белые кружки) и Rmix(-) (крестики) образцов и калибровочные образцы (сплошные линии), содержащие 10^3 – 10^6 копий мишени Qt. (Б) калибровочный график (калибровочные образцы содержали 10^3 , 10^4 , 10^5 и 10^6 копий/мкл).



Рис. 3.73. Влияние многократного замораживания раствора Rmix(+) на скорость мультимеризации. Пунктирная линия при Tt = 110 мин соответствует порогу клинической значимости (приведены данные для пары праймеров F-S2/R-S2).

Таким образом, разработан способ обнаружения РНК-мишеней, основанный на MM. Он требует использования только одного фермента – ДНК-полимеразы, обладающей активностями обратной транскриптазы и ДНК-зависимой ДНК-полимеразы, а также цепьвытесняющей активностью. Предлагаемый способ позволяет обнаруживать РНК даже в образцах, подвергшихся замораживанию. Его можно использовать дополнительно или как альтернативу известным методам в тех случаях, когда они не обеспечивают получение надежного результата.

3.6. ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ И СПЕЦИФИЧНОСТИ АМПЛИФИКАЦИИ НК

Повышение эффективности реакций амплификации НК заключается в ускорении их протекания и увеличении выхода целевых продуктов. Оно может быть достигнуто несколькими способами, одним из которых является использование дополительных агентов – ПЦР-энхансеров. На специфичность амплификации НК влияет множество факторов; пути ее повышения могут включать повышение реакционной и мишеньспецифичности праймеров, использование высокоточных полимераз, обеспечение чистоты рабочего пространства и реактивов.

3.6.1. 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. Олигосахарид инулин и полисахарид фиколл 400, будучи высокомолекулярными водорастворимыми производными фруктозы и глюкозы, были взяты для сравнения с низкомолекулярными углеводами. В качестве контроля брали также ДМСО и трегалозу, использование которых в ПЦР описано ранее.

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 λ , и две мишени – из генома человека (H-S и H-L) (Приложение, табл. П5). Данные мишени были представлены высококопийными (MR-S, MR-M и MR-L) и уникальными нуклеотидными последовательностями (H-S и H-L). ДНК λ 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 (табл. 2.2, №№4-6, табл. 2.3, №№ 53, 54, 77, 78, 89, 90, табл.

2.11, №№363-354). Соотнесение праймеров и амплифицируемых локусов представлено в таблице 3.27.

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 (рис. 3.74А).

Таблица	3.27.	Олигонуклеотиды	, использованные при	и оценке влияния	углеводов на ПЦР
---------	-------	-----------------	----------------------	------------------	------------------

мишень	праймеры	размер ампликона, п.о.		
	F2	252		
MR-S	R'352	352		
	F2	505		
MR-M	R1029	525		
	F1	1020		
MR-L	R1029	1029		
11.0	phL F6	342		
pnL-S	phL R6			
ah I M	phL-L F	1010		
pnL-w	phL-L R	1019		
phI I	phL-XL F	2062		
piit-t	phL-XL R	3063		
II C	RASSF1 R F	100		
п-э	RASSF1 R R	177		
11.1	RASSF1 MS F	702		
H-L	RASSF1 MS R	/93		

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 (рис. 3.74Б).

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 ΔСt, полученным для образцов с содержанием ПЦР-энхансеров в количестве 2, 4, 6, 8 или 10% масс. (Приложение, табл. Пб). Значения ΔСt определяли как разницу между значениями Ct исследуемых образцов (Х% добавок) и положительного контроля (0% добавок). В целом, ПЦР ускорялась в присутствии большинства сахаридов. Влияние углеводов было схожим для всех ДНК-мишеней, при этом GC-состав не сказывался заметно на эффективности амплификации. Однако положительный эффект от присутствия углеводов в реакционной смеси нивелировался при амплификации протяженных ДНК-мишеней, что связано, вероятно, с особенностями диссоциации длинных цепей ДНК.



Рис. 3.74. ПЦР-амплификация в присутствии сахарозы. (А) Результаты амплификации MR-M с помощью разных ДНК-полимераз в отсутствие углеводов (8% ПААГ). (Б) Влияние сахарозы (10%) на амплификацию протяженных ДНК-мишеней (1% агароза): дорожки 1, 2 – phL-S (342 п.о.), 3, 4 – phL-L (1019 п.о.), 5, 6 – phL-XL (3063 п.о.); дорожки 1, 3, 5 – амплификация без сахарозы, дорожки 2, 4, 6 – амплификация в присутствии 10% сахарозы. (В) кривые амплификации и (Г) кривые плавления ПЦР-образцов с трегалозой: 1 – 10%, 2 – 8%, 3 – 6%, 4 – 4%, 5 – 2%, 6 – 0% трегалозы, 7 – отрицательный контроль (М – ДНК-маркер 100 п.о.).

Максимальные значения Δ Ct получены для образцов, содержащих сахарозу или маннозу, или 6-10% трегалозы, или 4-10% глюкозы, или 4-10% фруктозы (рис. 3.75А, показано на примере MR-M). Высокие концентрации лактозы, галактозы, инулина и фиколла 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. Максимальный выход целевого продукта наблюдался в присутствии сахарозы и фруктозы (рис. 3.75Б).



Рис. 3.75. Влияние углеводов на протекание ПЦР (на примере участка MR-M, стандартные условия ПЦР, использован ПЦР-микс с красителем EvaGreen). (А) Изменение значений Сt в присутствии соответствующих добавок. (Б) Накопление специфических и неспецифических продуктов в присутствии добавок: I – высокомолекулярные продукты, II – ампликон длиной около 3000 п.о., III – шмер (NC – отрицательный контроль).

Однако в некоторых случаях наряду со специфическим ампликоном происходило образование и неспецифических продуктов, которые условно можно отнести к трем различным группам ДНК-продуктов: І) длинноцепочечная ДНК (не проникает в ПААГ), ІІ) продукт амплификации длиной около 3000 п.о. и ІІІ) ДНК различной длины, образующие шмер. ДНК типа І образовывалась во всех ПЦР-образцах, в том числе без углеводов. Ампликон II накапливался в образцах, содержавших ДМСО, глюкозу, маннозу и трегалозу, и не обнаруживался в образцах, содержавших сахарозу, фруктозу и фиколл 400. Для фиколла 400 и низких концентраций лактозы, галактозы, инулина и фруктозы наблюдалось эффективное образование продукта типа III.

Температуры плавления продуктов амплификации удовлетворительно коррелировали со специфичностью ПЦР и значениями Ct (табл. 3.28).

Побариа	Концентрация							
дооавка	10%	8%	6%	4%	2%	0%		
Трегалоза	93,0	93,5	93,5	94,0	91,0	93,0		
Сахароза	93,0	93,0	93,5	93,5	94,0	93,5		
Лактоза	93,0	93,5	93,8	88,0	88,5	93,0		
Глюкоза	92,5	93,0	93,3	93,8	94,3	93,0		
Манноза	93,5	93,5	93,0	93,5	94,0	93,5		
Галактоза	93,0	93,5	93,5	87,8	88,5	93,0		
Фруктоза	93,0	93,5	93,5	93,5	93,5	93,5		
Инулин	93,8	94,0	94,0	88,5	89,0	93,0		
Фикол 400	88,8	88,5	89,0	89,0	89,0	93,0		
ДМСО	86,5	89,0	90,0	91,5	92,8	93,5		

Таблица 3.28. Температура плавления ПЦР-продуктов (°С), полученных при амплификации участка MR-M в присутствии углеводов.

ПЦР-образцы, содержавшие моно- и дисахариды, показали Tm, которые были близки или равны Tm целевого ампликона, полученного в отсутствие добавок, тогда как образцы, которые не содержали специфичного продукта, но содержали ДНК типа III, характеризовались более низкими Tm. Повышение концентрации ДМСО постепенно снижало Tm ампликонов. Удивительно, но зависимости Tm от концентрации трегалозы не наблюдалось, хотя ранее сообщалось, что трегалоза значительно снижает Tm ДНК [Turner, Jenkins, 1995]. Таким образом, несмотря на более высокий выход целевого продукта в присутствии большинства углеводов, реакционная специфичность ПЦР была в некоторых случаях недостаточной, и только сахароза обеспечила удовлетворительное качество амплификации. При отсутствии добавок в образцах отрицательного контроля неспецифические продукты не образовывались.

3.6.2. Повышение специфичности LAMP

Считается, что 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 (гомо- и гетеродимеров), приводящих к неспецифическим ампликонам, снижающим достоверность анализа. Следовательно, дизайн LAMP-праймеров нужно осуществлять с особой тщательностью, предъявляя более строгие требования к их подбору. Для обеспечения высокой специфичности LAMP и обнаружения разрушенных НК необходимо также, на наш взгляд, стремиться к уменьшению расстояния между сайтами F1 и B1, F2 и F3, B2 и B3, соответственно (рис. 1.2, Глава 1).

Совместно с коллегами из Института нефтехимии и катализа УФИЦ РАН были разработаны алгоритм и новая компьютерная программа для конструирования LAMPпраймеров, названная LAMPrimers iQ. В их основе лежат следующие особенности: 1) возможность подбора праймеров с максимально допустимым сближением, 2) подбора возможность праймеров основе протяженных нуклеотидных на последовательностей (верхний предел не ограничен), 3) исключение праймеров, способных образовывать гомо- и гетеродимеры (учитывается перекрывание двух и более З'-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 LAMPrimers iQ имеет простой и интуитивно понятный англоязычный интерфейс (рис. 3.76А):

(A)



Рис. 3.76. Интерфейс программы LAMPrimers iQ. (А) главное окно (загрузка нуклеотидной последовательности), (Б) окно с результатами подбора праймеров.

Главное окно содержит три кнопки: "Открыть файл" (Open File), "Вставить последовательность" (Paste Sequence) и "Параметры дизайна праймера" (Primer Design Parameters). "Открыть файл" вызывает диалоговое окно, в котором можно выбрать файл iO нуклеотидной последовательности. **LAMPrimers** позволяет загружать последовательности нуклеотидов через буфер обмена или из любого текстового файла, включая FASTA. При нажатии "Вставить последовательность" появляется окно для вставки последовательности любой длины. "Параметры дизайна праймеров" открывает окно, в котором можно изменить расстояние между праймерами, длину мишени, разницу между длинами праймеров и Tm, а также концентрацию одновалентного катиона (Na⁺). По умолчанию в этом окне заданы стандартные (наиболее применяемые) значения длин праймеров, GC-состава и Tm. После задания параметров поиска и последовательности нуклеотидов и нажатия кнопки "Поиск" программа генерирует праймеры. Первый набор праймеров вызывается после нажатия на кнопку "Открыть результаты"; в отдельном окне появляется список праймеров, выделенных разными цветами (рис. 3.76Б). С помощью

курсора можно оценить расстояния между ними. Текущий набор праймеров можно сохранить в виде таблицы Excel, нажав кнопку "Сохранить в Excel". Для перемещения между наборами праймеров необходимо использовать кнопки "Далее" или "Предыдущий". Программа LAMPrimers iQ в представляемом здесь варианте не позволяет проводить множественные выравнивания нуклеотидных последовательностей, однако совершенствование функционала программы постоянно продолжается.

Количество выдаваемых наборов праймеров зависит от заданных параметров поиска: чем жестче параметры, тем меньше наборов генерируется. Так, на примере генома фага Лямбда показано, что на количество подбираемых наборов праймеров наиболее существенно влияет размер амплифицируемой области: при длине 160 п.о. формируются или единичные наборы, или они не находятся вовсе (табл. 3.29). Как следствие, становится необходимым анализ более длинных нуклеотидных последовательностей.

GC%	ЛТm	максимальный размер амплифицируемой области, п.о.				
	GC% ΔTm максимальный разма 40-60 5 213 40-60 2 198 45-55 5 132 45-55 2 116 50-60 5 195 55-65 5 160 2 134 1	230	160			
40-60	5	213	119	3		
10 00	2	198	184	3		
45-55	5	132	80	0		
45-55	2	116	64	0		
50-60	5	195	185	4		
20.00	2	181	164	4		
55-65	5	160	147	4		
	2	134	105	0		

Таблица 3.29. Количество наборов LAMP-праймеров, найденных для генома фага Лямбда, в зависимости от заданных параметров поиска.

Предварительную экспериментальную оценку праймеров, сконструированных с помощью LAMPrimers 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 LAMPrimers iQ, а также альтернативных программ NEB LAMP Primer Design и PrimerExplorer (наборы L, N и P соответственно) (табл. 3.30 и табл. 2.8, №№ 319-330). Хотя для выбора праймеров были заданы одни и те же параметры, LAMPrimers iQ генерировала более длинные праймеры по сравнению с остальными программами.

Таблица 3.30. Олигонуклеотиды, использованные для обнаружения РНК коронавируса SARS-CoV-2 с помощью LAMP-праймеров, подобранных разными компьютерными программами.

Шифр	Посцеловательность 5'→3'					
шифр		HT				
sc2 F3 L	GAAGTCCCTGTTGCTATTCATGCAGAT	27				
sc2 B3 L	TTGACTAGCTACACTACGTGCCC	23				
sc2 FIP L	CCTATTAAACAGCCTGCACGTGTTTGTACTCCTACTTGGCGTGTTT	53				
	ATTCTAC					
sc2 BIP L	CCGATGAGACTTAGTCTGAGTCTGATACTCATATGAGTGTGACAT	53				
	ACCCATTG					
sc2 F3 N	CAGAAGTCCCTGTTGCTAT	19				
sc2 B3 N	CGATGAGACTTAGTCTGAGT	20				
sc2 FIP N	TGCACGTGTTTGAAAAACATTAGAATCATGCAGATCAACTTACTC	46				
50211111	C					
sc2 BIP N	GGCTGTTTAATAGGGGCTGAATATCTGATAACTAGCGCATATACC	47				
502 211 11	TG					
sc2 F3 P	CAGAAGTCCCTGTTGCTAT	19				
sc2 B3 P	GGATTGACTAGCTACACTACG	21				
sc2 FIP P	GCCTGCACGTGTTTGAAAAACACATGCAGATCAACTTACTCC	42				
sc2 BIP P	AATAGGGGCTGAATATGTCAACAACTCTGAGTCTGATAACTAGCG	45				

Для амплификации РНК-мишеней с помощью LAMP необходимо провести предварительно отдельный этап обратной транскрипции или использовать ДНКполимеразы с обратно-транскриптазной активностью (вариант OT-LAMP). В данной работе брали Bst 3.0, обладающую свойствами и ДНК-, и РНК-зависимой ДНКполимеразы. Для исключения зависимых от образца отклонений, влияющих на эффективность и специфичность реакции, был использован сбалансированный РНКсодержащий препарат путем смешивания экстрактов мазков из носоглотки пациентов с COVID-19. Сравнительный LAMP-анализ проводили для всех трех комплектов праймеров (наборы L, N и P) в идентичных условиях (в едином эксперименте). Обнаружено, что праймеры, сгенерированные с использованием NEB LAMP Primer Design, обеспечивали наиболее ранний старт ЭСР (кривая амплификации N+), однако приводили также и к раннему накоплению неспецифических продуктов (N-) (рис. 3.77), что в целом характерно для LAMP. Хотя разница между специфической и неспецифической амплификацией для этих праймеров оказалась достаточной для выявления PHK патогена, абсолютная специфичность анализа все же не была достигнута.



Рис. 3.77. Кривые амплификации, полученные при выявлении генетического материала коронавируса SARS-CoV-2. (А) Подписи L, N и P соответствуют наборам праймеров, выбранным с помощью: L – LAMPrimers iQ, N – NEB LAMP Primer Design и P – PrimerExplorer, соответственно; "+" образцы содержали PHK коронавируса SARS-CoV-2 (использовался один и тот же образец Rmix(+)для всех наборов праймеров), "-" 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 HK (выделен синим цветом).

Праймеры, сгенерированные программой LAMPrimers iQ, обеспечили более поздний подъем кривых амплификации для тестовых образцов (L+) по сравнению с праймерами N. Ho, в отличие от последних, они не приводили к неспецифической амплификации и позволили получить более надежные результаты. Образцы, содержавшие праймеры, сконструированные с помощью PrimerExplorer, показали самый поздний подъем кривых амплификации для тестовых образцов (P+) и ОК (P-).

Применимость праймеров, подобранных LAMPrimers iQ, для выявления патогенной РНК была верифицирована на выборке клинических образцов, полученных от больных с подтвержденным диагнозом COVID-19 и от пациентов с подозрением на COVID-19 (рис. 3.77Б). Значения Тt для SARS-CoV-2-положительных образцов находились в пределах 20-30 мин; для образцов из остальных групп значения Tt превышали 50 мин (табл. 3.31). Даже для разведений смешанного образца Rmix(+) найдены значения Tt, значительно превышающие таковые для OK (рис. 3.77Б).

Образец	ПЦР	LAMP	Диагноз*	Образец	ПЦР	LAMP	Диагноз	Образец	ПЦР	LAMP	Диагноз
	Ct	Tt			Ct	Tt			Ct	Tt	
# 1	27±1	21±3	+	# 16	29±2	25±3	+	# 31	40±3	59±7	сомнит.
# 2	25±0	20±2	+	# 17	30±2	26±2	+	# 32	40±3	54±6	сомнит.
# 3	31±2	23±2	+	# 18	28±0	34±3	+	# 33	40±5	56±4	сомнит.
# 4	28±2	22±1	+	# 19	26±1	29±2	+	# 34	41±3	50±5	сомнит.
# 5	33±2	23±2	+	# 20	24±2	23±2	+	# 35	39±4	57±6	сомнит.
# 6	32±2	29±1	+	# 21	28±2	26±3	+	# 36	49±5	>60	-
#7	24±0	22±3	+	# 22	31±2	23±2	+	# 37	44±5	55±8	-
# 8	37±2	30±2	+	# 23	27±1	27±2	+	# 38	46±4	53±4	-
# 9	26±1	27±3	+	# 24	32±1	35±3	+	# 39	51±6	>60	-
# 10	25±1	21±3	+	# 25	26±0	24±2	+	# 40	48±3	55±5	-
# 11	32±2	27±2	+	# 26	40±2	54±7	сомнит.	# 41	43±5	>60	-
# 12	30±0	27±2	+	# 27	40±2	59±5	сомнит.	# 42	45±4	>60	-
# 13	34±2	29±3	+	# 28	40±5	>60	сомнит.	# 43	48±6	>60	-
# 14	31±1	26±4	+	# 29	41±4	>60	сомнит.	# 44	44±4	58±6	-
# 15	28±1	21±2	+	# 30	39±4	58±6	сомнит.	# 45	59±5	>60	-

Таблица 3.31. Средние значения порогового цикла Сt и порогового времени Tt (мин), полученные по результатам ПЦР и LAMP-анализа образцов, полученных от пациентов с подозрением на COVID-19.

* "+" – SARS-CoV-2-положительные, "-" – SARS-CoV-2-отрицательные образцы, "сомнит." – образцы от пациентов с сомнительными результатами ПЦР-анализа на наличие коронавируса SARS-CoV-2 в назофарингеальном мазке.

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 содержавших PHK-мишень, не перекрывались, что позволило дифференцировать эти типы образцов и с высокой достоверностью выявлять патогенную PHK.

Еще одним способом повышения специфичности LAMP может служить подавление неспецифической изотермической амплификации. Выше было показано, что слабокислотные анионные полиэлектролиты (на примере натриевой соли полиаспарагиновой кислоты, pAsp) способны ингибировать побочные реакции синтеза ДНК (раздел 3.4.2). Демонстрацию применимости рАѕр-опосредованного ингибирования неспецифической амплификации в ходе LAMP-анализа провели на примере РНКматериала коронавируса SARS-CoV-2. Использованные для этого праймеры srs-F3, srs-B3, srs-FIP, srs-BIP были подобраны с помощью NEB LAMP Primer Design (табл. 2.8, №№ 318-321). Амплификацию проводили в варианте LAMP с обратной транскрипцией (с добавлением обратной транскриптазы MMLV). Для образцов без pAsp обнаружение PHK патогена происходило в течение 10-15 мин (рис. 3.78А, кривая 2), однако наблюдался и ранний (20-25 мин) подъем кривых амплификации для ОК (рис. 3.78А, кривая 3).



Рис. 3.78. Повышение специфичности LAMP с помощью слабокислотного анионного полиэлектролита pAspI на примере обнаружения PHK SARS-CoV-2. (А) Кривые амплификации для ПК (кривые 1 и 4), тестируемого образца (2 и 5) и ОК (кривые 3 и 6). Сплошные кривые соответствуют образцам без pAspI, пунктирные – содержащим 0,01% масс. pAspI. (Б) Электрофоретический анализ результатов LAMP: дорожки 1 и 4 – ПК, 2 и 5 – тестируемые образцы, 3 и 6 – ОК, М – маркер 50 bp DNA ladder.

Столь небольшая разница между значениями Тt тестовых образцов и ОК не является удовлетворительной. Хотя добавление pAspI ингибировало амплификацию

мишени, приводя к некоторому повышению значений Tt (рис. 3.78А, кривые 4 и 5), оно полностью предотвращало неспецифический ДНК-синтез (рис. 3.78А, кривая 6). Электрофоретический анализ показал образование типичных для LAMP продуктов амплификации, которые проявляются в геле в виде групп полос разной длины (рис. 3.78Б, дорожки 1, 2, 4, 5). В то же время для ОК в отсутствие pAspI наблюдалась лестница полос, характерная для мультимеризации (рис. 3.78Б, дорожка 3), а для ОК в присутствии pAspI амплификация не протекала (рис. 3.78Б, дорожка 6). Полученные результаты демонстрируют возможность повышения с помощью слабокислотных анионных полиэлектролитов достоверности обнаружения НК-мишеней в ходе изотермической амплификации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Развитие методов амплификации НК в контексте их использования для обнаружения НК-мишеней (молекулярной диагностики) определяется типом и состоянием анализируемой НК и включает решение вопросов, связанных с обеспечением высокой специфичности и чувствительности анализа. Расширение спектра доступных методов происходит в том числе за счет появления новых молекулярных инструментов и совершенствования технологической базы. Однако амплификационно-опосредованный анализ кцНК (в первую очередь разрушенных НК) до сих пор остается трудоемким и относительно затратным, 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. Небольшие (короткие) молекулы НК, к которым можно отнести не только исследуемые кцНК, но также праймеры и продукты их димеризации, обладают праймероподобными свойствами, что, учитывая экспоненциальный характер реакций амплификации, обеспечивает для них высокую эффективность наработки неспецифических продуктов матричного синтеза. Следует также принимать во внимание способность полимераз вести нематричный ДНК-синтез. 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 реакций амплификации НК-мишеней в препаратах кцНК и поиску новых подходов к их анализу.

Первая часть работы посвящена изучению контекстно-зависимых свойств ДНК, неспецифической активности цепь-вытесняющих ДНК-полимераз (на примере Bst exo-) и особенностей протекания ПЦР-амплификации при использовании системы сближенных праймеров. Во второй части отражены результаты поиска новых подходов и преимущества их применения при анализе "сложных" НК-мишеней. Объектами исследования явились: 1) нуклеиновые кислоты: тотальная ДНК, выделенная из тканей различных растений и животных, из объектов биологического происхождения, в том числе подвергшихся воздействию факторов внешней среды, коммерческая (ДНК фага Лямбда) и синтетические (одноцепочечные) ДНК и РНК, в том числе с искусственно

сконструированными нуклеотидными последовательностями, и полученная посредством ПЦР-амплификации (ДНК-ампликоны), 2) цепь-вытесняющие ДНК-полимеразы.

При выполнении работы решено несколько задач. На модели ультразвукового облучения изучено влияние ряда факторов на характер фрагментации ДНК под действием механических сил. Впервые для этой цели использованы относительно короткие молекулы дцДНК – ДНК-ампликоны, имеющие определенную (конечную) длину и первичную структуру. ДНК-ампликоны являются более удобной моделью дцДНК по сравнению с геномной ДНК. Они позволили провести первичную оценку влияния конформационных параметров дцДНК на расщепление данных молекул. Впервые количественную ПЦР изучения предложено использовать для механической фрагментации ДНК, а также показано влияние на этот процесс 5-метилцитозина. Знания о характере разрушения ДНК имеют большую практическую ценность, поскольку ориентируют исследователей на этапе выбора нуклеотидных последовательностей для дальнейшей работы, обеспечивая бо́льшую точность анализа. Результаты, полученные в данной части работы, можно рассматривать в качестве задела, поскольку возможно и целесообразно дальнейшее изучение отдельных аспектов УЗ-фрагментации НК, например, механическое расщепление РНК. В целом, можно отметить, что при решении диагностических задач определяющим является выбор удачной амплификационной мишени, который должен осуществляться с учетом контекстно-зависимых свойств НК. Предложен способ сравнительной оценки статуса метилирования ДНК, основанный на ПЦР-амплификации образцов ДНК, подвергнутых УЗ-облучению. Он принципиально отличается от существующих подходов, которые включают ферментативные или химические превращения молекул ДНК.

Несмотря на то, что многие методические аспекты ПЦР были ранее подробно изучены, в данной работе удалось продемонстрировать особенности протекания и преимущества ПЦР со сближенными праймерами в сравнении с классической ПЦР. Показана применимость такой молекулярной системы для обнаружения специфических НК-мишеней в материалах, подвергшихся разрушительному действию внешних факторов. Особо стоит подчеркнуть высокую чувствительность и возможность существенного сокращения продолжительности ПЦР-анализа при использовании сближенных праймеров. Однако, поскольку ПЦР с праймерами "встык" характеризуется более высокой чувствительностью (предел обнаружения может достигать единичных копий мишени), данную особенность нужно принимать во внимание в тех случаях, когда предполагается возможная контаминация рабочего пространства или реактивов. Детально, с

использованием в том числе модельных систем, исследованы условия димеризации праймеров в ПЦР.

Впервые показано, что, помимо ДНК-полимеразы Bst exo-, и другие цепьвытесняющие ДНК-полимеразы способны вести ММ. Оказалось, что ММ протекает в условиях, способствующих "дыханию" цепей ДНК. Протекание ММ достаточно подробно изучено для Bst exo-. Определены условия, ДНК-полимеразы способствующие мультимеризации, раскрыт механизм И предложено несколько способов ee предотвращения данной реакции. Показана успешность протекания амплификации под действием ДНК-полимеразы Bst exo- в присутствии таких альтернативных кофакторов как Ca²⁺, Cd²⁺ и Cu²⁺. Оценено их влияние на протекание как специфической, так и неспецифической изотермической амплификации. Показана предпочтительность связывания ДНК-полимеразы Bst с пурин-богатыми нуклеотидными последовательностями. Результаты, полученные в этом блоке работы, позволят качественный дизайн молекулярной осуществлять системы для проведения изотермической амплификации и создать новые мутантные формы цепь-вытесняющих ДНК-полимераз, обеспечивающие высокую точность и специфичность амплификации.

Ha основе концепции о предпочтительности использования в реакциях амплификации сближенных праймеров предложено несколько подходов к анализу специфических НК. Так, определены параметры проведения ПЦР в стандартных ПЦРпробирках в режиме термоконвекции, показана успешность обнаружения НК-мишеней в ходе конвекционной ПЦР. Предложен способ определения половой принадлежности биоматериалов человека путем анализа делеционных полиморфных локусов. Предложены оригинальные способы оценки уровня зрелых форм миРНК и обнаружения вирусных РНК с помощью мультимеризации. Разработан способ получения небольших одноцепочечных кольцевых ДНК из разрушенной дцДНК с помощью Т4 РНК-лигазы путем внутримолекулярного нематричного лигирования. Предложен способ типирования микродиплотипов, основанный на амплификации "катящимся кольцом" и последующем секвенировании продуктов данной реакции. Разработана компьютерная программа для петлевой амплификации подбора праймеров для изотермической (LAMP), обеспечивающих ее бо́льшую реакционную специфичность.

Полученные результаты способствуют более глубокому пониманию процессов, происходящих при фрагментации молекул НК под действием механических сил и связанных с протеканием неспецифического ДНК-синтеза при амплификации разрушенных НК-мишеней. Данные о влиянии нуклеотидного контекста на разрушение ДНК по определенным сайтам должны учитываться в работе, когда предполагается

нахождение НК во фрагментированном состоянии. Данные о способности цепьвытесняющих ДНК-полимераз вызывать мультимеризацию ДНК и о предпочтительности их связывания с нуклеотидными последовательностями определенного состава позволят разработать подходы, обеспечивающие бо́льшую достоверность результатов изотермической амплификации. Полученные в рамках диссертационной работы данные могут применяться как в научных исследованиях, так и на практике непосредственно 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 ДНКскоростью под действием ультразвука расщепляются последовательности с равномерным распределением и средней плотностью 5'-CG-3' (в среднем один 5'-СС-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 ППЬ 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°С с сохранением высокой эффективности реакции. ПЦР с праймерами "встык" характеризуется более высокими специфичностью чувствительностью, менее чувствительна И К действию ингибирующих агентов, способна обеспечить диагностически значимое обнаружение РНК-мишеней с помощью ДНК-полимеразы Таq 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 exo- 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 Mg²⁺ и Mn²⁺, но также Ca²⁺, Cd²⁺ и Cu²⁺. Наиболее предпочтительным альтернативным кофактором является Mn²⁺, который в сочетании с Mg²⁺ 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 миРНК, 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 Т4 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 LAMPrimers iQ, позволяющая, в отличие от альтернативных программных средств, использовать протяженные нуклеотидные последовательности и задавать жесткие критерии при подборе LAMP-праймеров.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Abdullah Al-Maskri A.A., Ye J., Talap J., Hu H., Sun L., Yu L., Cai S., Zeng S. Reverse transcription-based loop-mediated isothermal amplification strategy for real-time miRNA detection with phosphorothioated probes // Anal. Chim. Acta. – 2020. – V. 1126. – P. 1-6.
- Abildgaard A., Tovbjerg S.K., Giltay A., Detemmerman L., Nissen P.H. Lactase persistence genotyping on whole blood by loop-mediated isothermal amplification and melting curve analysis // Clin. Chim. Acta. – 2018. – V. 482. – P. 50-56.
- Abolmaaty A., Gu W., Witkowsky R., Levin R.E. The use of activated charcoal for the removal of PCR inhibitors from oyster samples // J. Microbiol. Methods. – 2007. – V. 68(2). – P. 349-352.
- Abu Al-Soud W, Rådström P. Effects of amplification facilitators on diagnostic PCR in the presence of blood, feces, and meat // J. Clin. Microbiol. – 2000. – V. 38(12). – P. 4463-4470.
- Abu Al-Soud W., Râdström P. Capacity of nine thermostable DNA polymerases to mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting samples // Appl. Environ. Microbiol. - 1998. – V. 64(10). – P. 3748-3753.
- Abu Al-Soud W.A., Ouis I.S., Li D.Q., Ljungh S., Wadström T. Characterization of the PCR inhibitory effect of bile to optimize real-time PCR detection of Helicobacter species // FEMS Immunol. Med. Microbiol. – 2005(1). – V. 44(2). – P. 177-182.
- Abu Al-Soud W.A., Rådström P. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells // J. Clin. Microbiol. – 2001. – V. 39(2). – P. 485-493.
- Acién P., Acién M. Disorders of Sex Development: Classification, Review, and Impact on Fertility // J. Clin. Med. – 2020. – V. 9(11). – P. 3555.
- Adey A., Morrison H.G., Asan, Xun X., Kitzman J.O., Turner E.H., Stackhouse B., MacKenzie A.P., Caruccio N.C., Zhang X., Shendure J. Rapid, low-input, low-bias construction of shotgun fragment libraries by high-density in vitro transposition // Genome Biol. – 2010. – V. 11 (12). – R119.
- Agrawal N., Ugaz V.M. A buoyancy-driven compact thermocycler for rapid PCR // J. Assoc. Lab. Automat. – 2006. – V. 11(4). – P. 217-221.
- Agrawal N., Ugaz V.M. A buoyancy-driven compact thermocycler for rapid PCR // Clin. Lab. Med. – 2007. – V.27. – P. 215-223.
- Ahmad A.I. Ghasemi A.I. New FRET primers for quantitative real-time PCR // Anal. Bioanal. Chem. – 2007. – V. 387(8). – P. 2737-2743.

- Ahmed M.U., Nahar S., Safavieh M., Zourob M. Real-time electrochemical detection of pathogen DNA using electrostatic interaction of a redox probe // Analyst. – 2013. – V. 138(3). – P. 907-915.
- Ahmed M.U., Saito M., Hossain M.M., Rao S.R., Furui S., Hino A., Takamura Y., Takagi M., Tamiya E. Electrochemical genosensor for the rapid detection of GMO using loop-mediated isothermal amplification // Analyst. 2009. V. 134(5). P. 966-972.
- Akane A., Matsubara K., Nakamura H., Takahashi S., Kimura K. Identification of the heme compound copurified with deoxyribonucleic acid (DNA) from bloodstains, a major inhibitor of polymerase chain reaction (PCR) amplification // J. Forens. Sci. 1994. V. 39(2). P. 362-372.
- Alaedd*ini* R. Forensic implications of PCR inhibition // Forensic Sci. Int. Genet. 2012. V. 6(3). – P. 297-305.
- Ali M.M., Li F., Zhang Z., Zhang K., Kang D.K., Ankrum J.A., Le X.C., Zhao W. Rolling circle amplification: a versatile tool for chemical biology, materials science and medicine // Chem. Soc. Rev. 2014. V. 43(10). P. 3324-3341.
- Allentoft M.E. Collins M., Harker D., Haile J., Oskam C.L., Hale M.L., Campos P.F., Samaniego J.A., Gilbert M.T.P., Willerslev E., Zhang G., Scofield R.P., Holdaway R.N., Bunce M. The half-life of DNA in bone: Measuring decay kinetics in 158 dated fossils // Proc. Res. Soc. B. – 2012. – V. 7(279). – P. 4724-4733.
- Alptekin B., Langridge P., Budak H. Abiotic stress miRNomes in the *Triticeae* // Funct. Integr. Genomics. – 2017. – V. 17. – P. 145-170.
- Álvarez-Fernández R. Explanatory chapter: PCR primer design // Methods Enzymol. –
 2013. V. 529. P. 1-21.
- Ambagala A., Fisher M., Goolia M., Nfon C., Furukawa-Stoffer T., Ortega Polo R., Lung O. Field-deployable reverse transcription-insulated isothermal PCR (RT-iiPCR) assay for rapid and sensitive detection of foot-and-mouth disease virus // Transbound Emerg. Dis. 2017. V.64(5). P. 1610-1623.
- An R., Li Q., Fan Y., Li J., Pan X., Komiyama M., Liang X. Highly efficient preparation of single-stranded DNA rings by T4 ligase at abnormally low Mg(II) concentration // Nucleic Acids Res. – 2017. – V. 45(15). – e139.
- Ansorge W.J. Next-generation DNA sequencing techniques // Nat. Biotechnol. 2009. –
 V. 25. P. 195-203.
- Aoi Y., Hosogai M., Tsuneda S. Real-time quantitative LAMP (loop-mediated isothermal amplification of DNA) as a simple method for monitoring ammonia-oxidizing bacteria // J. Biotechnol. 2006. V. 125(4). P. 484-491.
- Asari M., Watanabe S., Matsubara K., Shiono H., Shimizu K. Single nucleotide polymorphism genotyping by m*ini*-primer allele-specific amplification with universal reporter primers for identification of degraded DNA // Anal. Biochem. 2009. V. 386. P. 85-90.
- 26. Ashkenas J., Dennis J.W., Ho C.Y. Simple enzymatic means to neutralize DNA contamination in nucleic acid amplification // Biotechniques. 2005. V. 39. P. 69-73.
- 27. Ashrafi E.H., Paul N. Improved PCR specificity with hot start PCR primers // Biotechniques. 2009. V. 47. P. 789-790.
- Aslanzadeh J. Preventing PCR amplification carryover contamination in a clinical laboratory // Ann. Clin. Lab. Sci. – 2004.– V. 34(4). – P. 389-396.
- Ayyadevara S., Thaden J.J., Shmookler Reis R.J. Discrimination of primer 3'-nucleotide mismatch by Taq DNA polymerase during polymerase chain reaction // Anal. Biochem. 2000. V. 284(1). P. 11-18.
- Baar C., d'Abbadie M., Vaisman A., Arana M.E., Hofreiter M., Woodgate R., Kunkel T.A., Holliger P. Molecular breeding of polymerases for resistance to environmental inhibitors // Nucleic Acids Res. – 2011. – V. 39(8). – e51.
- 31. Balasuriya U.B., Lee P.Y., Tiwari A., Skillman A., Nam B., Chambers T.M., Tsai Y.L., Ma L.J., Yang P.C., Chang H.F., Wang H.T. Rapid detection of equine influenza virus H3N8 subtype by insulated isothermal RT-PCR (iiRT-PCR) assay using the POCKIT Nucleic Acid Analyzer // J. Virol. Methods. 2014. V. 207. P. 66-72.
- Balcells I., Cirera S., Busk P.K. Specific and sensitive quantitative RT-PCR of miRNAs with DNA primers // BMC Biotechnol. 2011. V. 11. P. 70.
- 33. Ball C.S., Light Y.K., Koh C.Y., Wheeler S.S., Coffey L.L., Meagher R.J. Quenching of Unincorporated Amplification Signal Reporters in Reverse-Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Enabling Bright, Single-Step, Closed-Tube, and Multiplexed Detection of RNA Viruses // Anal. Chem. – 2016. – V. 88(7). – P. 3562-3568.
- Banér J., Nilsson M., Isaksson A., Mendel-Hartvig M., Antson D.-O., Landegren U. More keys to padlock probes: mechanisms for high-throughput nucleic acid analysis// Curr. Opin. Biotechnol. – 2001. – V. 12. – P. 11-15.
- Bar T., Stahlberg A., Muszta A., Kubista M. Kinetic Outlier Detection (KOD) in real time PCR // Nucleic acids Res. – 2003. – V. 31(17). – e105.
- Barnwell P., Blanchard A.N., Bryant J.A., Smirnoff N., Fredweir A. Isolation of DNA from the highly mucilaginous succulent plant Sedum Telephium // Plant Mol. Biol. Rep. – 1998.
 V.16. – P. 133-138.

- Behlke M.A., Berghof-Jäger K., Brown T., et al. Polymerase Chain Reaction: Theory and Technology. – Caister Academic Press: 2019. – 262 p.
- Bélec L., Authier J., Eliezer-Vanerot M.C., Piédouillet C., Mohamed A.S., Gherardi RK. Myoglobin as a polymerase chain reaction (PCR) inhibitor: a limitation for PCR from skeletal muscle tissue avoided by the use of *Thermus thermophilus* polymerase // Muscle Nerve. – 1998. – V. 21(8). – P. 1064-1067.
- Bellassai N., D'Agata R., Spoto G. Isothermal circular strand displacement-based assay for microRNA detection in liquid biopsy // Anal. Bioanal. Chem. – 2022. – V. 414. – P. 6431-6440.
- 40. Beyerle E.R., Dinpajooh M., Ji H., von Hippel P.H., Marcus A.H., Guenza M.G. Dinucleotides as simple models of the base stacking-unstacking component of DNA 'breathing' mechanisms // Nucleic Acids Res. 2021. V. 49. P. 1872-1885.
- 41. Bhadra S., Maranhao A.C., Paik I., Ellington A.D. One-Enzyme Reverse Transcription qPCR Using Taq DNA Polymerase // Biochem. 2020. V. 59. P. 4638-4645.
- Bi S., Yue S., Zhang S. Hybridization chain reaction: a versatile molecular tool for biosensing, bioimaging, and biomedicine // Chem. Soc. Rev. – 2017. – V. 46. – P. 4281-4298.
- Biassoni R., Raso A. Quantitative Real-Time PCR. Methods and Protocols. Humana Pres: 2020. – 223 p.
- Bickley J. Short J.K., McDowell G., Parkes H.C. Polymerase chain reaction (PCR) detection of *Listeria monocytogenes* in diluted milk and reversal of PCR inhibiton caused by calcium ions // Lett. Appl. Microbiol. 1996. V. 22(2). P. 153-158.
- 45. Binladen J., Willerslev E. Why study ancient DNA damage? // J. Nord. Archaeol. Sci. –
 2010. V.14. P. 11-14.
- Birch D.E., Kolmodin L., Wong J., Zangenberg G.A., Zoccoli M.A., McKinney N., Young K.K.Y. Simplified hot start PCR // Nature. 1996. V. 381. P. 445-446.
- 47. Boonbanjong P., Treerattrakoon K., Waiwinya W., Pitikultham P., Japrung D. Isothermal Amplification Technology for Disease Diagnosis // Biosensors (Basel). – 2022. – V. 12(9). – P. 677.
- Borovko S., Shyla A., Korban V., Borovko A. Amelogenin test abnormalities revealed in Belarusian population during forensic DNA analysis // Forens. Sci. Int. Genet. – 2015. – V. 15. – P. 98-104.
- Borse T., Joshi P., Chaphalkar S. Biochemical Role of Ascorbic acid during the Extraction of Nucleic Acids in Polyphenol Rich Medicinal Plant Tissues // J. Plant Mol. Biol. Biotechnol. 2011. V.2. P. 1 7.

- Boss M., Arenz C. A Fast and Easy Method for Specific Detection of Circular RNA by Rolling-Circle Amplification // Chembiochem. – 2020. – V. 21(6). – P. 793-796.
- 51. Böttger E.C. Frequent contamination of Taq polymerase with DNA // Clin. Chem. 1990.
 V. 36(6). P. 1258-1259.
- Braid M.D., Daniels L.M., Kitts C.L. Removal of PCR inhibitors from soil DNA by chemical flocculation // J. Microbiol. Methods. - 2003. - V. 52(3). - P. 389-93.
- Briggs A.W., Stenzel U., Johnson P.L.F. et al. Patterns of damage in genomic DNA sequences from a Neandertal // Proc. Natl. Acad. Sci. 2007. V. 11 (104). P. 14616-14621.
- Brownie J., Shawcross S., Theaker J., Whitcombe D., Ferrie R., Newton C., Little S. The elimination of primer-dimer accumulation in PCR // Nucleic Acids Res. 1997. V. 25. P. 3235-3241.
- 55. Bukasov R., Dossym D., Filchakova O. Detection of RNA viruses from influenza and HIV to Ebola and SARS-CoV-2: a review // Anal. Methods. 2021. V. 13. P. 34-55.
- Bunemann H., Muller W. Base specific fractionation of double stranded DNA: aff*inity* chromatography on a novel type of adsorbent // Nucleic Acids Res. 1978. V. 5. P. 1059-1074.
- Burton J.N., Liachko I., Dunham M.J., Shendure J. Species-Level Deconvolution of Metagenome Assemblies with Hi-C–Based Contact Probability Maps // G3: Genes Genomes Genetics. – 2014. – V. 4(7). – P. 1339-1346.
- Cai S., Jung C., Bhadra S., Ellington A.D. Phosphorothioated Primers Lead to Loop-Mediated Isothermal Amplification at Low Temperatures // Anal. Chem. – 2018. – V. 90(14). – P.8290-8294.
- 59. Campos P. F., Willerslev E., Sher A. et al. Ancient DNA analyses exclude humans as the driving force behind late Pleistocene musk ox (*Ovibos moschatus*) population dynamics // Proc. Nat. Acad. Sci. 2010. V. 107(12). P. 5675-5680.
- Cao G., Kong J., Xing Z., Tang Y., Zhang X., Xu X., Kang Z., Fang X., Guan M. Rapid detection of CALR type 1 and type 2 mutations using PNA-LNA clamping loop-mediated isothermal amplification on a CD-like microfluidic chip // Anal. Chim. Acta. 2018. V. 1024. P. 123-135.
- Cao H., Zhou X., Zeng Y. Microfluidic Exponential Rolling Circle Amplification for Sensitive microRNA Detection Directly from Biological Samples // Sens. Actuators B Chem. – 2019. – V. 279. – P. 447-457.

- Carlos F.F., Veigas B., Matias A.S., Doria G., Flores O., Baptista P.V. Allele specific LAMP-gold nanoparticle for characterization of single nucleotide polymorphisms // Biotechnol. Rep. (Amst). – 2017. – V. 16. – P. 21-25.
- Carossino M., Li Y., Lee P.A., et al. Evaluation of a field-deployable reverse transcriptioninsulated isothermal PCR for rapid and sensitive on-site detection of Zika virus // BMC Infect. Dis. – 2017. – V. 17(1). – P. 778.
- Castro-Vázquez L., Díaz-Maroto M.C., González-Viñas M.A., Pérez-Coello M.S. Differentiation of monofloral citrus, rosemary, eucalyptus, lavender, thyme and heather honeys based on volatile composition and sensory descriptive analysis // Food Chem. – 2009. – V. 112(4). – P. 1022-1030.
- Cavalieri L.F., Rosenberg B.H. Shear Degradation of Deoxyribonucleic Acid // J. Amer. Chem. Soc. – 1959. – V. 81. – P. 5136-5139.
- 66. Centeno-Cuadros A., Abbasi I., Nathan R. Sex determination in the wild: a field application of loop-mediated isothermal amplification successfully determines sex across three raptor species // Mol. Ecol. Resour. – 2017. – V. 17(2). – P. 153-160.
- Ceppell*ini* R., Curtoni E. S., Mattiuz P. L., Miggiano V., Scudeller G., Serra A. Genetics of leukocyte antigens: A family study of segregation and linkage / In Curtoni E.S., Mattiuz P.L., Tosi R.M. (eds.): Histocompatibility Testing, – Copenhagen: Munksgaard. – 1967, – P. 149-187.
- Chai H., Wang M., Zhang C., Tang Y., Miao P. Highly Sensitive Genosensing Coupling Rolling Circle Amplification with Multiple DNAzyme Cores for DNA Walking // Bioconj. Chem. – 2020. – V. 31. – P. 764-769.
- Chakrabarti R., Schutt C.E. Novel sulfoxides facilitate GC-rich template amplification // Biotechniques. – 2002. – V. 32(4). – P. 866-872.
- Chakrabarti R., Schutt C.E. The enhancement of PCR amplification by low molecularweight sulfones // Gene. - 2001. - V. 274. - P. 293-298.
- Champlot S., Berthelot C., Pruvost M., Bennett E.A., Grange T., Geigl E.M. An efficient multistrategy DNA decontamination procedure of PCR reagents for hypersensitive PCR applications // PLoS ONE. – 2010. – V. 5. – e13042.
- 72. Chander Y., Koelb J., Puckett J., Moser M.J., Klingele A.J., Liles M.R., Carrias A., Mead D.A., Schoenfeld T.W. A novel thermostable polymerase for RNA and DNA loop-mediated isothermal amplification (LAMP) // Front. Microbiol. 2014. V. 5. P. 395.
- 73. Chang H.F., Tsai Y.L., Tsai C.F., Lin C.K., Lee P.Y., Teng P.H., Su C., Jeng C.C. A thermally baffled device for highly stabilized convective PCR // Biotech. J. 2012. V. 7(5). P. 662-666.

- 74. Chang W., Liu W., Liu Y., Zhan F., Chen H., Lei H., Liu Y. Colorimetric detection of nucleic acid sequences in plant pathogens based on CRISPR/Cas9 triggered signal amplification // Mikrochim. Acta. – 2019. – V. 186(4). – P. 243.
- 75. Chartoumpekis D.V., Wakabayashi N., Kensler T.W. Keap1/Nrf2 pathway in the frontiers of cancer and cell metabolism // Biochem. Soc. Trans. 2015. V. 43. P. 639-644.
- 76. Chemeris A.V., Nikonorov Yu.M., Romanenkova M.L., Chemeris D.A., Garafutdinov R.R., Magazova R.A., Maleev G.V., Vakhitov V.A., Vasilov R.G. Novel methods of amplifying DNA or RNA with real-time PCR / US Patent No 8,198,026 B2. 12.06.2012.
- 77. Chen C., Ridzon D.A., Broomer A.J., Zhou Z., Lee D.H., Nguyen J.T., Barbisin M., Xu N.L., Mahuvakar V.R., Andersen M.R., Lao K.Q., Livak K.J., Guegler K.J. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR // Nucleic Acids Res. 2005. V. 33. e179.
- Chen Z., Qian S., Abrams W.R., Malamud D., Bau H.H. Thermosiphon-based PCR reactor: experiment and modeling // Anal. Chem. – 2004. – V. 76(13). – P. 3707-3715.
- Cheng Y., Dong L., Zhang J., Zhao Y., Li Z. Recent advances in microRNA detection // Analyst. – 2018. – V. 143(8). – P. 1758-1774.
- Cheong J.K., Y.C. Tang, L. Zhou, H. Cheng, H.P. Too, Advances in quantifying circulatory microRNA for early disease detection // Curr. Opin. Biotechnol. 2022. V. 74. P. 256-262.
- Chevet E., Lemaître G., Katinka M.D. Low concentrations of tetramethylammonium chloride increase yield and specificity of PCR // Nucleic Acids Res. 1995. V. 23(16). P. 3343-3344.
- Chou Q., Russell M., Birch D.E., Raymond J., Bloch W. Prevention of pre-PCR mispriming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications // Nucleic Acids Res. – 1992. – V. 20(7). – P. 1717-1723.
- 83. Chou W.P., Chen P.H., Miao M.Jr., Kuo L.S., Yeh S.H., Chen P.J. Rapid DNA amplification in a capillary tube by natural convection with a single isothermal heater // Biotechniques. 2017. V. 50(1). P. 52-57.
- Christian A.T., Pattee M.S., Attix C.M., Reed B.E., Sorensen K.J., Tucker J.D. Detection of DNA point mutations and mRNA expression levels by rolling circle amplification in individual cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2001. – V. 98(25). – P. 14238-14243.
- Chua K.H., Lee P.C., Chai H.C. Development of insulated isothermal PCR for rapid on-site malaria detection // Malar. J. – 2016. – V.15. – P. 134.

- Chuang T.L., Wei S.C., Lee S.Y., Lin C.W. A polycarbonate based surface plasmon resonance sensing cartridge for high sensitivity HBV loop-mediated isothermal amplification // Biosens. Bioelectron. – 2012. – V. 32(1). – P. 89-95.
- 87. Chumakov K.M. Reverse transcriptase can inhibit PCR and stimulate primer-dimer formation // PCR Methods Appl. 1994. V. 4(1). P. 62-64.
- Chung K.H., Choi Y.H., Jung M.Y. Natural convection PCR in a disposable polymer chip // IEEE Sens. Conf. – 2009. – P. 1217-1220.
- 89. Chung K.H., Park S.H., Choi Y.H. A palmtop PCR system with a disposable polymer chip operated by the thermosiphon effect // Lab. Chip. 2010. V. 10(2). P. 202-210.
- 90. Chung K-H., Lee D-S., Pyo H-B., Park S-H. Natural convection-driven PCR apparatus and method using disposable polymer chip / US Patent No 8,735,103 B2. 27.05.2014.
- 91. Ciftci S., Neumann F., Hernández-Neuta I., Hakhverdyan M., Bálint Á., Herthnek D., Madaboosi N., Nilsson M. A novel mutation tolerant padlock probe design for multiplexed detection of hypervariable RNA viruses // Sci Rep. – 2019. – V. 9(1). – 2872.
- 92. Clarke A.C., Prost S., Stanton J.A. White W.T., Kaplan M.E., Matisoo-Smith E.A. From cheek swabs to consensus sequences: an A to Z protocol for high-throughput DNA sequencing of complete human mitochondrial genomes // BMC Genomics. 2014. V. 15 (1). P. 68.
- 93. Clermont D., Santoni S., Saker S., Gomard M., Gardais E., Bizet C. Assessment of DNA encapsulation, a new room-temperature DNA storage method // Biopreserv. Biobank. 2014. V. 12(3). P. 176-183.
- Cohen J., Duke R.C. Glucocorticoid activation of a calcium-dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death // J. Immunol. – 1984. – V. 132. – P. 38-42.
- 95. Colotte M., Couallier V., Tuffet S., Bonnet J. Simultaneous assessment of average fragment size and amount in minute samples of degraded DNA // Anal. Biochem. – 2009. – V. 388. – P. 345-347.
- Comey C.T., Koons B.W., Presley K.W., Smerick J.B., Sobieralski C.A., Stanley D.M., Baechtel F.S. DNA extraction strategies for amplified fragment length polymorphism analysis // J. Forens. Sci. – 1994. – V. 39. – P. 1254-1269.
- 97. Cook R.F., Barrandeguy M., Lee P.A., Tsai C.F., Shen Y.H., Tsai Y.L., Chang H.G., Wang H.T., Balasuriya U.B.R. Rapid detection of equine infectious anemia virus nucleic acid by insulated isothermal RT-PCR assay to aid diagnosis under field conditions // Equine Vet. J. 2018. V. 51(4). P. 489-494.

- 98. Cooke K.L., Frenzer P., Tucker S.J., Crawford P.C., Kirk S.K., Levy J.K. Rapid diagnosis of *Babesia gibsoni* by Point-of-Need Testing by insulated isothermal PCR in dogs at high risk of infection // J. Vet. Intern. Med. – 2018. – V.32(1). – P. 232-235.
- 99. Dabney J., Knapp M., Glocke I., et al. Complete mitochondrial genome sequence of a Middle Pleistocene cave bear reconstructed from ultrashort DNA fragments // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2013b. – V. 110. – P. 15758–15763.
- 100. Dabney J., Meyer M., Pääbo S. Ancient DNA damage // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2013a. V. 5. a012567.
- 101. Dąbrowski S., Kur J. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the recombinant Histagged DNA polymerases from *Pyrococcus furiosus* and *Pyrococcus woesei* // Prot. expres. and purif. – 1998. – V. 14(1). – P. 131-138.
- 102. D'Agata R., Spoto G. Advanced methods for microRNA biosensing: a problem-solving perspective // Anal. Bioanal. Chem. 2019. V. 411. P. 4425-4444.
- 103. Dahl F., Banér J., Gullberg M., Mendel-Hartvig M., Landergen U., Nilsson M. Circle-tocircle amplification for precise and sensitive DNA analysis // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2004. – V. 101. – P. 4548–4553.
- 104. Davidson J.F., Fox R., Harris D.D., Lyons-Abbott S., Loeb L.A. Insertion of the T3 DNA polymerase thioredoxin binding domain enhances the processivity and fidelity of Taq DNA polymerase // Nucleic Acids Res. 2003. V. 31(16). P. 4702-4709.
- 105. Davis A.W., Phillips D.R. A defined molecular-weight distribution of deoxyribonucleic acid after extensive sonication // Biochem. J. – 1978. – V. 173. – P.179-183.
- 106. de Castillo Agudo L., Gavidia I., Pérez-Bermúdez P., Segura J. PEG precipitation, a required step for PCR amplification of DNA from wild plants of *Digitalis obscura* L. // Biotechniques. 1995. V. 18(5). P. 766-768.
- 107. de Sousa Dias M., Hernan I., Pascual B., Borràs E., Mañé B., Gamundi M.J., Carballo M. Detection of novel mutations that cause autosomal dominant ret*ini*tis pigmentosa in candidate genes by long-range PCR amplification and next-generation sequencing // Mol. Vis. 2013. V. 19. P. 654-64.
- 108. Declerck K., Vanden Berghe W. Back to the future: Epigenetic clock plasticity towards healthy aging // Mech. Ageing Develop. 2018. V. 174. P. 18-29.
- 109. Demeke T., Adams R.P. The effects of plant polysaccharides and buffer additives on PCR
 // Biotechniques. 1992. V. 12(3). P. 332-334.
- 110. Demeke T., Jenkins G.R. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits // Anal. Bioanal. Chem. – 2010. – V. 396. – P. 1977-1990.

- 111. Demidov V.V., Broude N.E. DNA amplification: current technologies and applications /
 1st ed. Horizon Bioscience: Wymondham, 2004. 336 p.
- 112. Deng R., K. Zhang, J. Li, Isothermal Amplification for MicroRNA Detection: From the Test Tube to the Cell // Acc. Chem. Res. – 2017. – V. 50. – P. 1059-1068.
- 113. Didenko Y.T., McNamara W.B., Suslick K.S. Temperature of multibubble sonoluminescence in water // J. Phys. Chem. A. 1999. V. 103(50). P. 10783-10788.
- 114. Dietrich D., Uhl B., Sailer V., Holmes E.E., Jung M., Meller S., Kristiansen G. Improved PCR Performance Using Template DNA from Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Tissues by Overcoming PCR Inhibition // PLoS ONE. – 2013. – V. 8. – e77771.
- 115. Ding S., Chen R., Chen G., et al. One-step colorimetric genotyping of single nucleotide polymorphism using probe-enhanced loop-mediated isothermal amplification (PE-LAMP)
 // Theranostics. 2019. V. 9(13). P. 3723-3731.
- 116. Ding X., Clark K.D., Varona M., Emaus M.N., Anderson J.L. Magnetic ionic liquidenhanced isothermal nucleic acid amplification and its application to rapid visual DNA analysis // Anal. Chim. Acta. – 2019. – V. 1045. – P. 132-140.
- 117. Ding X., Yin K., Chen J., Wang K., Liu C. A ribonuclease-dependent cleavable beacon primer triggering DNA amplification for single nucleotide mutation detection with ultrahigh sensitivity and selectivity // Chem. Commun. (Camb). – 2019. – V. 55(84). – P. 12623-12626.
- 118. Ding X., Yin K., Li Z., Pandian V., Smyth J.A., Helal Z., Liu C. Cleavable hairpin beaconenhanced fluorescence detection of nucleic acid isothermal amplification and smartphonebased readout // Sci. Rep. – 2020. – V. 10(1). – 18819.
- 119. Dolinnaya N.G., Blumenfeld M., Merenkova I.N., Oretskaya T.S. Krynetskaya N.F. Ivanovskaya M.G., Vasseur M., Shabarova Z.A. Oligonucleotide circularization by template-directed chemical ligation // Nucleic Acids Res. – 1993. – V. 21(23). – P. 5403-5407.
- 120. Dong J., Xu Q., Li C.C., Zhang C.Y. Single-color multiplexing by the integration of high-resolution melting pattern recognition with loop-mediated isothermal amplification // Chem. Commun. (Camb). 2019. V. 55(17). P. 2457-2460.
- 121. Dong X., Liu L., Tu Y., Zhang J., Miao G., Zhang L., Ge S., Xia N., Yu D., Qiu X. Rapid PCR powered by microfluidics: A quick review under the background of COVID-19 pandemic // Trends Anal. Chem. – 2021. – V. 143. – P. 116377.
- 122. Doronin S.V., Nevinsky G.A., Malygina T.O., Podust V.N., Khomov V.V., Lavrik O.I. The efficiency of interaction of deoxyribonucleoside-5'-mono-, di- and triphosphates with the

active center of *E. coli* DNA polymerase I Klenow fragment // FEBS Lett. – 1989. – V. 259(1). – P. 83-85.

- 123. Doty P., McGill B.B., Rice S.A. The properties of sonic fragments of deoxyribose nucleic acid // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1958. – V. 44. – P. 432-438.
- 124. Doyle J.J. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue // Phytochem. Bull. 1987. V. 19. P. 11-15.
- 125. Du W., Lv M., Li J., Yu R., Jiang J. A ligation-based loop-mediated isothermal amplification (ligation-LAMP) strategy for highly selective microRNA detection // Chem. Commun. (Camb). – 2016. – V. 52(86). – P. 12721-12724.
- 126. Dutta D., Naiyer S., Mansuri, S., Soni N., Singh V., Bhat K.H., Singh N., Arora G., Mansuri M.S. COVID-19 Diagnosis: A Comprehensive Review of the RT-qPCR Method for Detection of SARS-CoV-2 // Diagnostics (Basel). – 2022. – V. 12. – P. 1503.
- 127. Dwyer D.E., Saksena N. Failure of ultra-violet irradiation and autoclaving to eliminate PCR contamination // Mol. Cell. Probes. – 1992. – V. 6(1). – P. 87-88.
- 128. Eckhart L., Bach J., Ban J., Tschachler E. Melanin binds reversibly to thermostable DNA polymerase and inhibits its activity // Biochem. Biophys. Res. Comm. 2000. V. 271(3). P. 726-730.
- 129. Ehricht R., Hotzel H., Sachse K., Slickers P. Residual DNA in thermostable DNA polymerases a cause of irritation in diagnostic PCR and microarray assays // Biologicals. 2007. V. 35(2). P. 145-147.
- Elhamamsy A.R. Role of DNA methylation in imprinting disorders: an updated review // J. Assist. Reprod. Genet. – 2017. – V. 34. – P. 549-562.
- Ellison S.L., Emslie K.R., Kassir Z. A standard additions method reduces inhibitor-induced bias in quantitative real-time PCR // Anal. Bioanal. Chem. – 2011. – V. 401(10). – P. 3221-3227.
- Elsner H.I., Lindblad E.B. Ultrasonic degradation of DNA // DNA. 1989. V. 8. P. 697-701.
- 133. Engler M.J., Lechner R.L., Richardson C.C. Two forms of the DNA polymerase of bacteriophage T7 // J. Biol. Chem. – 1983. – V. 258(18). – P. 11165-11173.
- 134. Erickson D.L., Smith B.D., Clarke A.C., Sandweiss D.H., Tuross. N. An Asian origin for a 10000-year-old domesticated plant in the Americas // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005. V. 102(51). P. 18315-18320.
- 135. Faber K.L., Person E.C., Hudlow W.R. PCR inhibitor removal using the NucleoSpin DNA Clean-Up XS kit // Forensic Sci. Int. Genet. – 2013. – V. 7(1). – P. 209-213.

- 136. Fairfax M.R., Metcalf M.A., Cone R.W. Slow inactivation of dry PCR templates by UV light // PCR Methods Appl. – 1991. – V. 1(2). – P. 142-143.
- 137. Fakruddin M., Mannan K.S., Chowdhury A., Mazumdar R.M., Hossain M.N., Islam S., Chowdhury M.A. Nucleic acid amplification: Alternative methods of polymerase chain reaction // J. Pharm. Bioall. Sci. – 2013. – V. 5(4). – P. 245-252.
- 138. Faruqi A.F., Hosono S., Driscoll M.D. et al. High-throughput genotyping of single nucleotide polymorphisms with rolling circle amplification // BMC Genomics. – 2001. –V. 2. – P. 4.
- 139. Faucett A.M., Islas A.L. Reiterative template switching: the effect of single-strand homopolymeric DNA on non-template-directed nucleotide addition by DNA polymerase // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2005. – V. 337. – P. 1030-1037.
- 140. Feeney M., Murphy K., Lopilato J. Designing PCR primers painlessly // J. Microbiol. Biol.
 Educ. 2014. V. 15(1). P. 28-29.
- 141. Fei Z., Wei R., Zhou D., Li N., Xiao P. A novel bioluminescent approach to the loopmediated isothermal amplification-based detection of *Lactobacillus salivarius* in feed samples // J. Microbiol. Methods. – 2021. – V. 187. – P. 106209.
- 142. Fire A., Xu S.Q. Rolling replication of short DNA circles // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. –
 1995. V. 92. P. 4641-4645.
- 143. Fischbach J., Xander N.C., Frohme M., Glökler J.F. Shining a light on LAMP assays--a comparison of LAMP visualization methods including the novel use of berberine // Biotechniques. 2015. V. 58(4). P. 189-194.
- 144. Francis F., Dumas M.D., Wisser R.J. ThermoAlign: a genome-aware primer design tool for tiled amplicon resequencing // Sci. Rep. – 2017. – V. 16(7). – P. 4437.
- 145. Frank-Kamenetskii M.D., Prakash S. Fluctuations in the DNA double helix: A critical review // Phys. Life Rev. – 2014. – V. 11. – P. 153-170.
- 146. Freifelder D., Davison P.F. Studies on the sonic degradation of deoxyribonucleic acid // Biophys. J. – 1962. – V. 2. – P. 235-247.
- 147. Friesner R.A., Banks J.L., Murphy R.B., et al. Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring.
 1. Method and Assessment of Docking Accuracy // J. Med. Chem. 2004. V. 47(7). P. 1739-1749.
- 148. Friesner R.A., Murphy R.B., Repasky M.P., Frye L.L., Greenwood J.R., Halgren T.A., Sanschagrin P.C., Mainz D.T. Extra Precision Glide: Docking and Scoring Incorporating a Model of Hydrophobic Enclosure for Protein-Ligand Complexes // J. Med. Chem. – 2006. – V. 49(21). – P. 6177-6196.

- 149. Froim D., Hopkins C.E., Belenky A., Cohen A.S. Method for phosphorothioate antisense DNA sequencing by capillary electrophoresis with UV detection // Nucleic Acids Res. – 1995. – V. 25. – P. 4219-4223.
- 150. Fuciarelli A.F., Sisk E.C., Thomas R.M., Miller D.L. Induction of base damage in DNA solutions by ultrasonic cavitation // Free Rad. Biol. Med. 1995. V.18. P.231-238.
- 151. Fujita N., Ayukawa Y., Fuke M., Teraoka T., Watanabe K., Arie T., Komatsu K. Rapid sex identification method of spinach (*Spinacia oleracea* L.) in the vegetative stage using loopmediated isothermal amplification // Planta. – 2017. – V. 245(1). – P. 221-226.
- 152. Fujiya Y., Sato Y., Katayama Y., et al. Viral load may impact the diagnostic performance of nasal swabs in nucleic acid amplification test and quantitative antigen test for SARS-CoV-2 detection // J. Infect. Chemother. – 2022. – V. 28. – P. 1590-1593.
- 153. Fukudome K., Yamaoka K., Nishikori K., Takahashi T., Yamamoto O. Ultrasonic scission of deoxyribonucleic acid in aqueous solution I. Conditions for sonication and molecular weights of sonicated samples // Polymer J. – 1986. – V. 18. – P. 71-79.
- 154. Fukudome K., Yamaoka K., Nishikori K., Takahashi T., Yamamoto O. Ultrasonic scission of deoxyribonucleic acid in aqueous solution II. Precipitational fractionation and molecular weights of sonicated samples // Polymer J. – 1986. – V. 18. – P. 81-88.
- 155. Gandelman O., Jackson R., Kiddle G., Tisi L. Loop-mediated amplification accelerated by stem primers // Int. J. Mol. Sci. – 2011. – V. 12(12). – P. 9108-9124.
- 156. Gandelman O.A., Church V.L., Moore C.A., Kiddle G., Carne C.A., Parmar S., Jalal H., Tisi L.C., Murray J.A. Novel bioluminescent quantitative detection of nucleic acid amplification in real-time // PLoS One. – 2010. – V. 5(11). – e14155.
- 157. Gansen A., Herrick A.M., Dimov I.K., Lee L.P., Chiu D.T. Digital LAMP in a sample selfdigitization (SD) chip // Lab. Chip. – 2012. – V. 12(12). – P. 2247-2254.
- 158. Gao X., Sun B., Guan Y. Pullulan reduces the non-specific amplification of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) // Anal. Bioanal. Chem. – 2019. – V. 411(6). – P. 1211-1218.
- 159. Gardner S.N., Jaing C.J., Elsheikh M.M., Peña J., Hysom D.A., Borucki M.K. Multiplex degenerate primer design for targeted whole genome amplification of many viral genomes // Adv. Bioinform. – 2014. – V. 2014. – P. 101894.
- 160. Garg N., Ahmad F.J., Kar S. Recent advances in loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for rapid and efficient detection of pathogens // Curr. Res. Microb. Sci. – 2022. – V. 3. – 100120.

- 161. Ge J., Hu Y., Deng R., Li Z., Zhang K., Shi M., Yang D., Cai R., Tan W. Highly Sensitive MicroRNA Detection by Coupling Nicking-Enhanced Rolling Circle Amplification with MoS2 Quantum Dots // Anal. Chem. – 2020. – V. 92(19). – P. 13588-13594.
- 162. Gefrides L.A., Powell M.C., Donley M.A., Kahn R. UV irradiation and autoclave treatment for elimination of contaminating DNA from laboratory consumables // Forensic Sci. Int. Genet. – 2010. – V. 4(2). – P. 89-94.
- 163. Geggier S., Vologodskii A. Sequence dependence of DNA bending rigidity // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2010. – V. 107 (35). – P. 15421-15426.
- 164. Gill P.D. Urquhart A., Millican E., Oldroyd N., Watson S., Sparkes R., Kimpton C.P. A new method of STR interpretation using inferential logic development of a criminal intelligence database // Int. J. Leg. Med. – 1996. – V. 109. – P. 14-22.
- 165. Gines G., Menezes R., Xiao W., Rondelez Y., Taly V. Emerging isothermal amplification technologies for microRNA biosensing: Applications to liquid biopsies // Mol. Aspects Med. – 2020 – V. 72. – 100832.
- 166. Glushkov S.A., Bragin A.G., Dymshits G.M. Decontamination of polymerase chain reaction reagents using DEAE-cellulose // Anal. Biochem. – 2009. – V. 393(1). – P. 135-137.
- 167. Goldenberger D., Perschil I., Ritzler M., Altwegg M. A simple "universal" DNA extraction procedure using SDS and proteinase K is compatible with direct PCR amplification // PCR Methods Appl. – 1995. – V. 4(6). – P. 368-370.
- 168. Gong L., Tang F., Liu E., Liu X., Xu H., Wang Y., Song Y., Liang J. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay combined with a nanoparticle-based lateral flow biosensor for rapid detection of plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr*-1 // PLoS One. – 2021. – V. 16(4). – e0249582.
- 169. Goodyear P.D., MacLaughlin-Black S., Mason I.J. A reliable method for the removal of co-purifying PCR inhibitors from ancient DNA // Biotechniques. – 1994. – V. 16(2). – P. 232-235.
- 170. Goto M., Honda E., Ogura A., Nomoto A., Hanaki K. Colorimetric detection of loopmediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue // Biotechniques. – 2009. – V. 46(3). – P. 167-172.
- 171. Green M.R., Sambrook J. Hot Start Polymerase Chain Reaction (PCR) // Cold Spring Harb.
 Protoc. 2018. V. 2018(5). P. 346-349.
- 172. Greenough L., Menin J.F., Desai N.S., Kelman Z., Gardner A.F. Characterization of family D DNA polymerase from *Thermococcus* sp. 9°N // Extremophiles. – 2014. – V. 18(4). – P. 653-664.

- 173. Grokhovsky S.L., Il'icheva I.A., Nechipurenko D.Y., Golovkin M.V., Panchenko L.A., Polozov R.V., Nechipurenko Y.D. Sequence-specific ultrasonic cleavage of DNA // Biophys. J. – 2011. – V.100(1) – P.117-125.
- 174. Gu L., Yan W., Liu L., Wang S., Zhang X., Lyu M. Research Progress on Rolling Circle Amplification (RCA)-Based Biomedical Sensing // Pharmaceuticals (Basel). – 2018. – V. 11(2). – e35.
- 175. Guixens-Gallardo P., Hocek M., Perlikova P. Inhibition of non-templated nucleotide addition by DNA polymerases in primer extension using twisted intercalating nucleic acid modified templates // Bioorg. Med. Chem. Lett. – 2016. – V. 26. – P. 288-291.
- 176. Gupta N., Augustine S., Narayan T., O'Riordan A., Das A., Kumar D., Luong J.H.T., Malhotra B.D. Point-of-Care PCR Assays for COVID-19 Detection // Biosensors (Basel). – 2021. – V. 11(5). – P. 141.
- 177. Gupta O.P., Permar V., Koundal V., Singh U.D., Praveen S. MicroRNA regulated defense responses in *Triticum aestivum* L. during *Puccinia graminis* f.sp. tritici infection // Mol. Biol. Rep. – 2012. – V. 39(2). – P. 817-824.
- 178. Gyarmati P., Song Y., Hällman J., Käller M. Chemical fragmentation for massively parallel sequencing library preparation // J. Biotechnol. 2013. V. 168. P. 95-100.
- Hafner G.J., Yang I.C., Wolter L.C., Stafford M.R., Giffard P.M. Isothermal amplification and multimerization of DNA by Bst DNA polymerase // Biotechniques. – 2001. – V. 30. – P. 852-86.
- 180. Hagerman P.J. Investigation of the flexibility of DNA using transient electric birefringence
 // Biopolymers. 1981. V. 20. P. 1503-1535.
- 181. Halgren T.A., Murphy R.B., Friesner R.A., Beard H.S., Frye L.L., Pollard W.T., Banks J.L. Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 2. Enrichment Factors in Database Screening // J. Med. Chem. 2004. V. 47(7). P. 1750-1759.
- 182. Hamidi T., Singh A.K., Chen T. Genetic alterations of DNA methylation machinery in human diseases // Epigenomics. – 2015. – V. 7. – P. 247-265.
- 183. Haned H., Benschop C.C.G., Gill P.D., Sijen T. Complex DNA mixture analysis in a forensic context: Evaluating the probative value using a likelihood ratio model // Forensic Sci. Int. Genet. – 2015. – V. 16. – P. 17-25.
- 184. Hanni C., Brousseau T., Laudet V., Stehelin D. Isopropanol precipitation removes PCR inhibitors from ancient bone extracts // Nucleic Acids Res. – 1995. – V. 23. – P. 881-882.
- 185. Hansen A.J., Mitchell D.L., Wiuf C., Paniker L., Brand T.B., Binladen J., Gilichinsky D.A., Rønn R., Willerslev E. Crosslinks rather than strand breaks determine access to

ancient DNA sequences from frozen sediments // Genetics. - 2006. - V. 173. - P.1175-1179.

- 186. Harrison B., Zimmerman S.B. Polymer-stimulated ligation: enhanced ligation of oligo- and polynucleotides by T4 RNA ligase in polymer solutions // Nucleic Acids Res. – 1984. – V. 12. – P. 8235-8251.
- 187. Hartman L.J., Coyne S.R., Norwood D.A. Development of a novel internal positive control for Taqman based assays // Mol. Cell. Probes. – 2005. – V. 19(1). – P. 51-59.
- 188. Hashimoto K., Inada M., Ito K. A novel voltammetric approach for real-time electrochemical detection of targeted nucleic acid sequences using LAMP // Anal. Biochem. – 2017. – V. 539. – P. 113-117.
- 189. Hatch A., Sano T., Misasi J., Smith C.L. Rolling circle amplification of DNA immobilized on solid surfaces and its application to multiplex mutation detection // Genet. Anal. – 1999. – V. 15(2). – P. 35-40.
- 190. Hayashi K., Orita M., Suzuki Y., Sekiya T. Use of labeled primers in polymerase chain reaction (LP-PCR) for a rapid detection of the product // Nucleic Acids Res. – 1989. – V. 17(9). – P. 3605.
- 191. Hedell R., Dufva Ch., Ansell R., Mostad P., Hedman J. Enhanced low-template DNA analysis conditions and investigation of allele dropout patterns // Forensic Sci. Int. Genet. – 2015. – V. 14. – P. 61-75.
- 192. Hedman J., Nordgaard A., Dufva C., Rasmusson B., Ansell R., Rådström P. Synergy between DNA polymerases increases polymerase chain reaction inhibitor tolerance in forensic DNA analysis // Anal. Biochem. – 2010. – V. 405(2). – P. 192-200.
- 193. Hendling M., Pabinger S., Peters K., Wolff N., Conzemius R., Barišic I. Oli2go: an automated multiplex oligonucleotide design tool // Nucleic Acids Res. – 2018. – V. 46(W1). – W252-W256.
- 194. Henke W., Herdel K., Jung K., Schnorr D., Loening S.A. Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences // Nucleic Acids Res. – 1997. – V. 25(19). – P. 3957-3958.
- 195. Hernández-Vásquez A., Barrenechea-Pulache A., Comandé D., Azañedo D. Mouthrinses and SARS-CoV-2 viral load in saliva: a living systematic review // Evid. Based Dent. – 2022. – P. 1-7.
- 196. Heyn P., Stenzel U., Briggs A.W., Kircher M., Hofreiter M., Meyer M. Road blocks on paleogenomes - polymerase extension profiling reveals the frequency of blocking lesions in ancient DNA // Nucleic Acids Res. – 2010. – V. 38(16). – e161.

- 197. Hiatt J.B., Patwardhan R.P., Turner E.H., Lee C., Shendure J. Parallel, tag-directed assembly of locally derived short sequence reads // Nature methods. – 2010. – V. 7(2). – P. 119-122.
- 198. Higgins O., Clancy E., Cormican M., Boo T.W., Cunney R., Smith T.J. Evaluation of an Internally Controlled Multiplex Tth Endonuclease Cleavage Loop-Mediated Isothermal Amplification (TEC-LAMP) Assay for the Detection of Bacterial Meningitis Pathogens // Int. J. Mol. Sci. – 2018. – V. 19(2). – P. 524.
- Higuchi H., Endo T., Kaji A. Enzymic synthesis of oligonucleotides containing methylphosphonate internucleotide linkages // Biochemistry. – 2009. – V. 29. – P. 8747-8753.
- 200. Hirayama H., Kageyama S., Moriyasu S., et al. Rapid sexing of bovine preimplantation embryos using loop-mediated isothermal amplification // Theriogenol. 2004. V. 62(5). P. 887-896.
- 201. Hofreiter M., Jaenicke V., Serre D., Haeseler A., Pääbo S. DNA sequences from multiple amplifications reveal artifacts induced by cytosine deamination in ancient DNA // Nucleic Acids Res. – 2001. – V.29. – P. 4793-4799.
- 202. Hofreiter M., Shapiro B. Ancient DNA: Methods and Protocols. Humana Press Inc., 2012. 247 p.
- 203. Hofreiter M., Sneberger J., Pospisek M., Vanek D. Progress in forensic bone DNA analysis: Lessons learned from ancient DNA // Forensic Sci. Int. Genet. – 2021. – V. 54. – e102538.
- 204. Holemon H., Korshunova Y., Ordway J.M., Bedell J.A., Citek R.W., Lakey N.J., Finney L.M., McPherson J.D., Jeddeloh J.A. MethylScreen: DNA methylation density monitoring using quantitative PCR // Biotechniques. 2007. V. 43. P. 683-693.
- 205. Holodniy M., Kim S., Katzenstein D., Konrad M., Groves E., Merigan T.C. Inhibition of human immunodeficiency virus gene amplification by heparin // J. Clin. Microbiol. – 1991. – V. 29(4). – P. 676-679.
- 206. Hong M., Zha L., Fu W., Zou M., Li W., Xu D. A modified visual loop-mediated isothermal amplification method for diagnosis and differentiation of main pathogens from *Mycobacterium tuberculosis* complex // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2012. – V. 28(2). – P. 523-531.
- 207. Horáková H., Polakovičová I., Shaik G., Eitler J., Bugajev V., Dráberová L., Dráber P. 1,2propanediol-trehalose mixture as a potent quantitative real-time PCR enhancer // BMC Biotechnol. – 2011. – V. 11. – e41.

- 208. Höss M., Jaruga P., Zastawny T.H., Dizdaroglu M., Pääbo S. DDNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues // Nucleic Acids Res. 1996. V. 24. P. 1304-1307.
- 209. Hou X., Pei Zh., Wei X. Primer Spanner: a web-based platform to design PCR primers for high efficient site-directed mutagenesis and DNA assembling // Minerva Biotechnologica. - 2018. - V. 30(1). P. 7-13.
- 210. Hsieh K., Mage P.L., Csordas A.T., Eisenstein M., Soh H.T. Simultaneous elimination of carryover contamination and detection of DNA with uracil-DNA-glycosylasesupplemented loop-mediated isothermal amplification (UDG-LAMP) // Chem. Commun. (Camb). – 2014. – V. 50(28). – P. 3747-3749.
- 211. Hsieh K., Patterson A.S., Ferguson B.S., Plaxco K.W., Soh H.T. Rapid, sensitive, and quantitative detection of pathogenic DNA at the point of care through microfluidic electrochemical quantitative loop-mediated isothermal amplification // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2012. V. 51(20). P. 4896-4900.
- 212. Hsieh Y.F., Lee D.S., Chen P.H., Liao S.K., Yeh S.H., Chen P.J., Yang A.S. A real-time convective PCR machine in a capillary tube instrumented with a CCD-based fluorometer // Sens. Act. B: Chem. 2013. V. 183. P. 434-440.
- 213. http://eu.idtdna.com/calc/analyzer
- 214. http://forensicdna.kr/cpgpnp/)
- 215. http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/loop.html).
- 216. http://mrprimerv.com)
- 217. http://ohalloranlab.net/STITCHER_2_0/index.html.
- 218. http://oli2go.ait.ac.at)
- 219. http://primer3.ut.ee),
- 220. http://primer3plus.com),
- 221. http://primerdigital.com/fastpcr.html)
- 222. http://ps.biocloud.org.cn)
- 223. http://www.primerxl.org)
- 224. https://bioedit.software.informer.com/],
- 225. https://eu.idtdna.com],
- 226. https://fluoresentric.com/principal-of-xcr/),
- 227. https://github.com/drmaize/ThermoAlign)
- 228. https://github.com/zoubinok/MIPE).
- 229. https://lamp.neb.com/#!/],
- 230. https://primer3.org/].

- 231. https://primerexplorer.jp/e/],
- 232. https://sourceforge.net/projects/methymer/)
- 233. https://totallab.com/].
- 234. https://www.dnastar.com/],
- 235. https://www.ensembl.org/index.html],
- 236. https://www.geneious.com/download/previous-versions/].
- 237. https://www.megasoftware.net/],
- 238. https://www.mirbase.org].
- 239. https://www.ncbi.nlm.nih.gov]
- 240. https://www.rcsb.org/].
- 241. https://www.schrodinger.com/].
- 242. Hu Y.J., Li Z.F., Diamond A.M. Enhanced discrimination of single nucleotide polymorphism in genotyping by phosphorothioate proofreading allele-specific amplification // Anal. Biochem. – 2007. – V. 369(1). – P. 54-59.
- 243. Huang M.M., Arnheim N., Goodman M.F. Extension of base mispairs by Taq DNA polymerase: implications for single nucleotide discrimination in PCR // Nucleic Acids Res. 1992. V. 20(17). P. 4567-4573.
- 244. Hussain J., Gill P., Long A. et al. Rapid preparation of SNP multiplexes utilising universal reporter primers and their detection by gel electrophoresis and microfabricated arrays // Prog. Forensic Genet. – 2003. – V. 1239. – P. 5-8.
- 245. Hwang H.J. Three-stage thermal convection apparatus and uses thereof / US Patent No 9,573,134 B2. 21.02.2017.
- 246. Hwang H.J. Three-stage thermal convection apparatus and uses thereof / US Patent No 10,086,374 B2. 02.10.2018a.
- 247. Hwang H.J. Two-stage thermal convection apparatus and uses thereof / US Patent No 10,086,375 B2. 02.10.2018b.
- 248. Hwang H.J., Kim J.H., Jeong K. Method and apparatus for amplification of nucleic acid sequences by using thermal convection / US Patent No 7,628,961 B2. 08.12.2009.
- 249. Hwang H.J., Kim J.H., Jeong K. Method and apparatus for amplification of nucleic acid sequences by using thermal convection / US Patent No 8,053,215 B2. 08.11.2011.
- 250. Hwang H.J., Kim J.H., Jeong K. Method and apparatus for amplification of nucleic acid sequences by using thermal convection // US Patent No 9,765,376 B2. 19.09.2017.
- 251. Ignatov K.B., Barsova E.V., Fradkov A.F., Blagodatskikh K.A., Kramarova T.V., Kramarov V.M. A strong strand displacement activity of thermostable DNA polymerase

markedly improves the results of DNA amplification // Biotechniques. – 2014. – V. 57(2). – P. 81-87.

- 252. Il'icheva I.A., Nechipurenko D.Y., Grokhovsky S.L. Ultrasonic cleavage of nicked DNA // J. Biomol. Struct. Dyn. – 2009. – V. 27(3). – P. 391-398.
- 253. Imai K., Tarumoto N., Misawa K., Runtuwene L.R., Sakai J., Hayashida K., Eshita Y., Maeda R., Tuda J., Murakami T., Maesaki S., Suzuki Y., Yamagishi J., Maeda T. A novel diagnostic method for malaria using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and *MinION* nanopore sequencer // BMC Infect. Dis. – 2017. – V. 17(1). – P. 621.
- 254. Irimia A., Zang H., Loukachevitch L.V., Eoff R.L., Guengerisch P., Egli M. Calcium is a cofactor of polymerization but inhibits pyrophosphorolysis by the *Sulfolobus solfataricus* DNA polymerase Dpo4 // Biochemistry. 2006. V. 45(19). P. 5949-5956.
- 255. Irizarry R.A., Ladd-Acosta C., Carvalho B., Wu H., Brandenburg S.A., Jeddeloh J.A., Wen B., Feinberg A.P. Comprehensive high-throughput arrays for relative methylation (CHARM) // Genome Res. 2008. V. 18. P. 780-790.
- 256. Itonaga M., Matsuzaki I., Warigaya K., Tamura T., Shimizu Y., Fujimoto M., Kojima F., Ichinose M., Murata S. Novel Methodology for Rapid Detection of *KRAS* Mutation Using PNA-LNA Mediated Loop-Mediated Isothermal Amplification // PLoS One. – 2016. – V. 11(3). – e0151654.
- 257. Iwamoto T., Sonobe T., Hayashi K. Loop-mediated isothermal amplification for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis complex*, *M. avium*, and *M. intracellulare* in sputum samples // J. Clin. Microbiol. – 2003. – V. 41(6). – P. 2616-2622.
- 258. Iwasaki H., Ezura Y., Ishida R., Kajita M., Kodaira M., Knight J., Daniel S., Shi M., Emi M. Accuracy of genotyping for single nucleotide polymorphisms by a microarray-based single nucleotide polymorphism typing method involving hybridization of short allele-specific oligonucleotides // DNA Res. 2002. V. 9(2). P. 59-62.
- 259. Jaroenram W., Cecere P., Pompa P.P. Xylenol orange-based loop-mediated DNA isothermal amplification for sensitive naked-eye detection of Escherichia coli // J. Microbiol. Methods. 2019. V. 156. P. 9-14.
- 260. Jaroenram W., Kampeera J., Arunrut N., Karuwan C., Sappat A., Khumwan P., Jaitrong S., Boonnak K., Prammananan T., Chaiprasert A., Tuantranont A., Kiatpathomchai W. Graphene-based electrochemical genosensor incorporated loop-mediated isothermal amplification for rapid on-site detection of *Mycobacterium tuberculosis* // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2020. – V. 186. – 113333.
- 261. Jaroenram W., Kampeera J., Arunrut N., Sirithammajak S., Jaitrong S., Boonnak K., Khumwan P., Prammananan T., Chaiprasert A., Kiatpathomchai W. Ultrasensitive

detection of Mycobacterium tuberculosis by a rapid and specific probe-triggered one-step, simultaneous DNA hybridization and isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick // Sci. Rep. -2020. - V. 10(1). - 16976.

- 262. Jaroenram W., Kiatpathomchai W., Flegel T.W. Rapid and sensitive detection of white spot syndrome virus by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick // Mol. Cell. Probes. – 2009. – V. 23(2). – P. 65-70.
- 263. Jiang H., Li Y., Lv X., Deng Y., Li X. Recent advances in cascade isothermal amplification techniques for ultra-sensitive nucleic acid detection // Talanta. – 2023. – V. 260. – P. 124645.
- 264. Jinno Y., Yoshiura K., Niikawa N. Use of psoralen as extinguisher of contaminated DNA in PCR // Nucleic Acids Res. 1990. V. 18(22). P. 6739.
- 265. Joffroy B., Uca Y.O., Prešern D., Doye J.P.K., Schmidt T.L. Rolling circle amplification shows a sinusoidal template length-dependent amplification bias // Nucleic Acids Res. – 2018. – V. 46. – P. 538-545.
- 266. Johnson S.J., Taylor J.S., Beese L.S. Processive DNA synthesis observed in a polymerase crystal suggests a mechanism for the prevention of frameshift mutations // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2003. – V. 100(7). – P. 3895-3900.
- 267. Johnston A.D., Lu J., Ru K.L., Korbie D., Trau M. PrimerROC: accurate conditionindependent dimer prediction using ROC analysis// Sci. Rep. – 2019. – V. 9(1). – P. 209.
- 268. Jung J.H., Oh S.J., Kim Y.T., Kim S.Y., Kim W.J., Jung J., Seo T.S. Combination of multiplex reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification with an immunochromatographic strip for subtyping influenza A virus // Anal. Chim. Acta. – 2015. – V. 853. P. 541-547.
- 269. Kaboev O.K., Luchkina L.A., Tret'iakov A.N., Bahrmand AR. PCR hot start using primers with the structure of molecular beacons (hairpin-like structure) // Nucleic Acids Res. – 2000. – V. 28(21). – e94.
- 270. Kalendar R., Tselykh T.V., Khassenov B., Ramanculov E.M. Introduction on Using the FastPCR Software and the Related Java Web Tools for PCR and Oligonucleotide Assembly and Analysis // Methods Mol. Biol. – 2017. – V. 1620. – P. 33-64.
- 271. Kalodimos C.G., Biris N., Bonvin A.M., Levandoski M.M., Guennuegues M., Boelens R., Kaptein R. Structure and flexibility adaptation in nonspecific and specific protein-DNA complexes // Science. – 2004. – V. 305(5682). – P. 386-389.
- 272. Kanchanaphum P. Time Course of Detection of Human Male DNA from Stained Blood Sample on Various Surfaces by Loop Mediated Isothermal Amplification and Polymerase Chain Reaction // Biomed. Res. Int. – 2018. – V. 2018. – P. 2981862.

- 273. Kang S.T., Hsieh Y.S., Feng C.T., Chen Y.T., Yang P.E., Chen W.M. miPrimer: an empirical-based qPCR primer design method for small noncoding microRNA // RNA. – 2018. – V. 24(3). – P. 304-312.
- 274. Karthik K., Rathore R., Thomas P., Arun T.R., Viswas K.N., Dhama K., Agarwal R.K. New closed tube loop mediated isothermal amplification assay for prevention of product cross-contamination // Methods X. – 2014. – V. 1. – P. 137-143.
- 275. Kashyap V.K., Sahoo S., Sitalaximi T., Trivedi R. Deletions in the Y-derived amelogenin gene in the Indian population // BMC Med. Genet. 2006. V. 7. P. 3.
- 276. Katcher H.L., Schwartz I. A distinctive property of Tth DNA polymerase: enzymatic amplification in the presence of phenol // Biotechniques. 1994. V. 16(1). P. 84-92.
- 277. Kaufmann, G. Klein T., Littauer U.Z. T4 RNA ligase: substrate chain length requirements // FEBS Lett. – 1976. – V. 46(5). – P. 271-275.
- 278. Kermekchiev M.B., Kirilova L.I., Vail E.E., Barnes W.M. Mutants of Taq DNA polymerase resistant to PCR inhibitors allow DNA amplification from whole blood and crude soil samples // Nucleic Acids Res. 2009. V. 37(5). e40.
- 279. Kermekchiev M.B., Tzekov A., Barnes W.M. Cold-sensitive mutants of Taq DNA polymerase provide a hot start for PCR // Nucleic Acids Res. 2003. V. 31. P. 6139-6447.
- 280. Khammanee T., Sawangjaroen N., Buncherd H., Tun A.W., Thanapongpichat S. A LAMP-SNP Assay Detecting C580Y Mutation in *Pfkelch13* Gene from Clinically Dried Blood Spot Samples // Korean J. Parasitol. – 2021. – V. 59(1). – P. 15-22.
- 281. Khodadadi E., Fahmideh L., Khodadadi E., Dao S., Yousefi M., Taghizadeh S., Asgharzadeh M., Yousefi B., Kafil H.S. Current Advances in DNA Methylation Analysis Methods // Biomed. Res. Int. – 2021. – V. 2021. – 8827516.
- 282. Kiatpathomchai W., Jaroenram W., Arunrut N., Jitrapakdee S., Flegel T.W. Shrimp Taura syndrome virus detection by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick // J. Virol. Methods. 2008. V. 153(2). P. 214-217.
- 283. Kidd K.K, Speed W.S., Pakstis A.J., Pod*ini* D.S, Lagacé R., Chang J., Wootton S., Haigh E., Soundararajan U. Evaluating 130 microhaplotypes across a global set of 83 populations // Forensic Sci. Int. Genet. 2017. V. 29. P. 29-37.
- 284. Kidd K.K. Criteria for selecting microhaplotypes: mixture detection and deconvolution // Investig. Genet. 2015. V. 6. P. 1.

- 285. Kidd K.K., Pakstis A.J., Speed W.S., Lagace R., Chang J., Wootton S., Ihuegbu N. Microhaplotype loci are a powerful new type of forensic marker // Forensic Sci. Int. Genet.: Suppl. Series. – 2013. – V. 4. – S. 1. – e123-e124.
- 286. Kim S., Labbe R.G., Ryu S. Inhibitory effects of collagen on the PCR for detection of *Clostridium perfringens* // Appl. Environ. Microbiol. – 2000. – V. 66(3). – P. 1213-1215.
- 287. King K.L., Wilson S., Napolitano J.M., Sell K.J., Rennert L., Parkinson C.L., Dean D. SARS-CoV-2 variants of concern Alpha and Delta show increased viral load in saliva // PLoS One. 2022. V. 17. e0267750.
- 288. Kitamura M., Kubo S., Tanaka J., Adachi T. Rapid screening method for male DNA by using the loop-mediated isothermal amplification assay // Int. J. Legal. Med. – 2018. – V. 132(4). – P. 975-981.
- 289. Kitchin P.A., Szotyori Z., Fromholc C., Almond N. Avoidance of PCR false positives [corrected] // Nature. – 1990. – V. 344(6263). – P. 201.
- 290. Klutstein M. Nejman D., Greenfield R., Cedar H. DNA methylation in cancer and aging // Cancer Res. – 2016. – V. 76(12). – P. 3446-3450.
- 291. Knorre D.G., Lavrik O.I., Nevinsky G.A. Protein-nucleic acid interaction in reactions catalyzed with DNA polymerases // Biochimie. 1988. V. 70(5). P. 655-661.
- 292. Koizumi M., Morita K., Takagi M., Yasumo H., Kasuya A. SNP genotyping by allelespecific PCR using ENA primers // Nucleic Acids Symp. Ser (Oxf). – 2005. – V. 49. – P. 47-48.
- 293. Kolocheva T.I., Nevinsky G.A., Levina A.S., Khomov V.V., Lavrik O.I. The mechanism of recognition of templates by DNA polymerases from pro- and eukaryotes as revealed by affinity modification data // J. Biomol. Struct. Dyn. – 1991. – V. 9(1). – P. 169-186.
- 294. Kolocheva T.I., Nevinsky G.A., Volchkova V.A., Levina A.S., Khomov V.V., Lavrik O.I. DNA polymerase I (Klenow fragment): role of the structure and length of a template in enzyme recognition // FEBS Lett. – 1989. – V. 248(1-2). P. 97-100.
- 295. Komori M., Komiya K., Shirakawa T., Morikawa T.J., Yoshimura T., Measurement of microRNA with isothermal DNA amplification on fully automated immunoassay analyzers // Anal. Bioanal. Chem. – 2019. V. 411. – P. 3789-3800.
- 296. Kontanis E.J., Reed F.A. Evaluation of real-time PCR amplification efficiencies to detect PCR inhibitors // J. Forensic Sci. 2006. V. 51(4). P. 795-804.
- 297. Koonjul P.K., Brandt W.F., Farrant J.M., Lindsey G.G. Inclusion of polyvinylpyrrolidone in the polymerase chain reaction reverses the inhibitory effects of polyphenolic contamination of RNA // Nucleic Acids Res. – 1999. – V. 27(3). – P. 915-916.

- 298. Kõressaar T., Lepamets M., Kaplinski L., Raime K., Andreson R, Remm M. Primer3_masker: integrating masking of template sequence with primer design software // Bioinformatics. 2018. V. 34(11). P. 1937-1938.
- 299. Koressaar T., Remm M. Enhancements and modifications of primer design program Primer3 // Bioinformatics. 2007. V. 23(10). P. 1289-1291.
- 300. Koshikawa S., Miyazaki S., Cornette R., Matsumoto T., Miura T. Genome size of termites (*Insecta, Dictyoptera, Isoptera*) and wood roaches (*Insecta, Dictyoptera, Cryptocercidae*) // Naturwissenschaften. – 2008. – V. 95(9). – P. 859-867.
- 301. Kouguchi Y., Fujiwara T., Teramoto M., Kuramoto M. Homogenous, real-time duplex loop-mediated isothermal amplification using a single fluorophore-labeled primer and an intercalator dye: Its application to the simultaneous detection of *Shiga* toxin genes 1 and 2 in *Shiga* toxigenic *Escherichia coli* isolates // Mol. Cell. Probes. 2010. V. 24(4). P. 190-195.
- 302. Kovárová M., Dráber P. New specificity and yield enhancer of polymerase chain reactions
 // Nucleic Acids Res. 2000. V. 28(13). e70.
- 303. Kranaster R., Marx A. Increased single-nucleotide discrimination in allele-specific polymerase chain reactions through primer probes bearing nucleobase and 2'-deoxyribose modifications // Chemistry. – 2007. – V. 13(21). – P. 6115-6122.
- 304. Krasnov G.S., Melnikova N.V., Lakunina V.A., Snezhkina A.V., Kudryavtseva A.V., Dmitriev A.A. MethyMer: Design of combinations of specific primers for bisulfite sequencing of complete CpG islands // J. Bioinform. Comput. Biol. – 2018. – V. 16(1). – P. 1840004.
- 305. Krause J., Dear H., Pollack J.L., Slatkin M., Spriggs H., Barnes I., Lister A.M., Ebersberger I., Pääbo S., Hofreiter M. Multiplex amplification of the mammoth mitochondrial genome and the evolution of *Elephantidae* // Nature. – 2006. – V. 439(7077). – P. 724–727.
- 306. Kreader C.A. Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein // Appl. Environ. Microbiol. 1996. V. 62(3). P. 1102-1106.
- 307. Kreutz J.E., Wang J., Sheen A.M., Thompson A.M., Staheli J.P., Dyen M.R., Feng Q., Chiu D.T. Self-digitization chip for quantitative detection of human papillomavirus gene using digital LAMP // Lab. Chip. – 2019. – V. 19(6). – P. 1035-1040.
- 308. Krishnan M., Agrawal N., Burns M.A., Ugaz V.M. Reactions and fluidics in m*ini*aturized natural convection systems // Anal. Chem. 2004. V. 76. P. 6254-6265.
- 309. Krishnan M., Ugaz V.M., Burns M.A. PCR in a Rayleigh-Benard convection cell // Science. 2002. V. 298. P. 793.

- 310. Krzywkowski T., Kühnemund M., Nilsson M. Chimeric padlock and iLock probes for increased efficiency of targeted RNA detection // RNA. – 2019. – V. 25(1). – P. 82-89.
- 311. Kumar P., Johnston B.H., Kazakov S.A. miR-ID: A novel, circularization-based platform for detection of microRNAs // RNA. – 2011. – V. 17(2). – P. 365-380.
- 312. Kuo H.C., Lo D.Y., Chen C.L., Tsai Y.L., Ping J.F., Lee C.H., Lee P.A., Chang H.G. Rapid and sensitive detection of *Mycoplasma synoviae* by an insulated isothermal polymerase chain reaction-based assay on a field-deployable device. // Poult Sci. 2017. V. 96(1). P.35-41.
- 313. Kurdyukov S., Bullock M. DNA methylation analysis: choosing the right method // Biology. - 2016. - V. 5(1). - P. 3.
- 314. Kurz M. Compatible solute influence on nucleic acids: many questions but few answers //
 Saline Syst. 2008. V. 4. P. 6.
- 315. Kuznetsov N.A., Kupryushkin M.S., Abramova T.V., Kuznetsova A.A., Miroshnikova A.D., Stetsenko D.A., Pyshnyi D.V., Fedorova O.S. New oligonucleotide derivatives as unreactive substrate analogues and potential inhibitors of human apur*inic*/apyrimid*inic* endonuclease APE1 // Mol. Biosyst. 2016. V. 12. P. 67-75.
- 316. Kuznetsova A.A., Fedorova O.S., Kuznetsov N.A. Structural and Molecular Kinetic Features of Activities of DNA Polymerases // Int. J. Mol. Sci. – 2022. – V. 23. –6373.
- 317. Kwok S., Higuchi R. Avoiding false positives with PCR // Nature. 1989. V. 339(6221).
 P. 237-238.
- 318. Kwok S., Kellogg D.E., McKinney N., Spasic D., Goda L., Levenson C., Sninsky J.J. Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: human immunodeficiency virus type 1 model studies // Nucleic Acids Res. – 1990. – V. 18(4). – P. 999-1005.
- 319. Lalhmangaihi R., Ghatak S., Laha R., Gurusubramanian G., Kumar N.S. Protocol for optimal quality and quantity pollen DNA isolation from honey samples // J. Biomol. Technol. – 2014. – V. 25(4). – P. 92.
- 320. Landgraf A., Reckmann B., Pingoud A. Quantitative analysis of polymerase chain reaction (PCR) products using primers labeled with biotin and a fluorescent dye // Anal. Biochem. – 1991. – V. 193(2). – P. 231-235.
- 321. Larguinho M., Santos H.M., Doria G., Scholz H., Baptista P.V., Capelo J.L. Development of a fast and efficient ultrasonic-based strategy for DNA fragmentation // Talanta. – 2010. – V. 81(3). – P. 881-886.

- 322. Latorra D., Campbell K., Wolter A., Hurley J.M. Enhanced allele-specific PCR discrimination in SNP genotyping using 3' locked nucleic acid (LNA) primers // Hum. Mutat. 2003. V. 22(1). P. 79-85.
- 323. Lauterbach S.E., Nelson S.N., Nolting J.M., Trujillo J.D., Richt J.A., Bowman A.S. Evaluation of a field-deployable insulated isothermal polymerase chain reaction Nucleic Acid Analyzer for Influenza A virus detection at swine exhibitions // Vector Borne Zoonotic Dis. – 2019. – V. 19(3). – P. 212-216.
- 324. Le Roux C.A., Kubo T., Grobbelaar A.A., van Vuren P.J., Weyer J., Nel L.H., Swanepoel R., Morita K., Paweska J.T. Development and evaluation of a real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Rift Valley fever* virus in clinical specimens // J. Clin. Microbiol. 2009. V. 47(3). P. 645-651.
- 325. Le T., Paul N. Improved PCR flexibility with hot start dNTPs // Biotechniques. 2009. –
 V. 47. P. 881-882.
- 326. Lebedev A.V., Paul N., Yee J., Timoshchuk V.A., Shum J., Miyagi K., Kellum J., Hogrefe R.I., Zon G. Hot start PCR with heat activatable primers: a novel approach for improved PCR performance // Nucleic Acids Res. 2008. V. 36. e131.
- 327. Lee H., Kim D.M., Kim D.E. Label-free fluorometric detection of influenza viral RNA by strand displacement coupled with rolling circle amplification // Analyst. – 2021a. – V. 145(24). – P. 8002-8007.
- 328. Lee J., Ashokkumar M., Kentish S., Grieser F. Determination of the size distribution of sonoluminescence bubbles in a pulsed acoustic field // J. Am. Chem. Soc. – 2005. – V. 127(48). – P. 16810-16811.
- 329. Lee J.E., Mun H., Kim S.R., Kim M.G., Chang J.Y., Shim W.B. A colorimetric Loopmediated isothermal amplification (LAMP) assay based on HRP-mimicking molecular beacon for the rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* // Biosens. Bioelectron. – 2020. V. 151. – 111968.
- Lee M J. Quantifying SARS-CoV-2 viral load: current status and future prospects // Expert. Rev. Mol. Diagn. – 2021b. – V. 21. – P. 1017-1023.
- 331. Lee M.F., Chen Y.H., Peng C.F. Evaluation of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification in conjunction with ELISA-hybridization assay for molecular detection of *Mycobacterium tuberculosis* // J. Microbiol. Methods. – 2009. – V. 76(2). –P. 174-180.

- 332. Lefever S., Pattyn F., De Wilde B., Coppieters F., De Keulenaer S., Hellemans J., Vandesompele J. High-throughput PCR assay design for targeted resequencing using primerXL // BMC Bioinform. – 2017.– V. 18(1). – P. 400.
- 333. Lefever S., Rihani A., Van der Meulen J., Pattyn F., Van Maerken T., Van Dorpe J., Hellemans J., Vandesompele J. Cost-effective and robust genotyping using doublemismatch allele-specific quantitative PCR // Sci. Rep. – 2019. V. 9(1). – 2150.
- 334. Lefevre J., Hankins C., Pourreaux K., Voyer H., Coutlée F. Canadian Women's HIV Study Group. Prevalence of selective inhibition of HPV-16 DNA amplification in cervicovaginal lavages // J. Med. Virol. – 2004. – V. 72. – P. 132-137.
- 335. Lentz Y.K., Anchordoquy T.J., Lengsfeld C.S. DNA acts as a nucleation site for transient cavitation in the ultrasonic nebulizer // J. Pharm. Sci. – 2006. – V. 95(3). – P. 607-619.
- 336. Lentz Y.K., Worden R., Anchordoquy T.J., Lengsfeld C.S. Effect of jet nebulization on DNA: identifying the dominant degradation mechanism and mitigation methods // J. Aer. Sci. – 2005. – V.36. – P. 973-990.
- 337. Li B., Chen X., Ellington A.D. Adapting enzyme-free DNA circuits to the detection of loop-mediated isothermal amplification reactions // Anal. Chem. – 2012. – V. 84(19). – P. 8371-8377.
- 338. Li C., Li Z., Jia H., Yan J. One-step ultrasensitive detection of microRNAs with loopmediated isothermal amplification (LAMP) // Chem. Commun. (Camb). – 2011. – V. 47(9). – P. 2595-2597.
- 339. Li J., Mohammed-Elsabagh M., Paczkowski F., Li Y. Circular Nucleic Acids: Discovery, Functions and Applications // Chembiochem. – 2020b. – V. 21(11). – P. 1547-1566.
- 340. Li M., Ge H., Sun Z., Fu J., Cao L., Feng X., Meng G., Peng Y., Liu Y., Zhao C. A loopmediated isothermal amplification-enabled analytical assay for the detection of SARS-CoV-2: A review // Front. Cell. Infect. Microbiol. – 2022. – V. 12. – 1068015.
- 341. Li Y., Wang J., Wang S., Wang J. Rolling circle amplification based colorimetric determination of *Staphylococcus aureus* // Mikrochim. Acta. – 2020a. – V. 187(2). – P. 119.
- 342. Liang C., Cheng S., Chu Y., Wu H., Zou B., Huang H., Xi T., Zhou G. A closed-tube detection of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) products using a wax-sealed fluorescent intercalator // J. Nanosci. Nanotechnol. – 2013. – V. 13(6). – P. 3999-4005.
- 343. Liang C., Chu Y., Cheng S., Wu H., Kajiyama T., Kambara H., Zhou G. Multiplex loopmediated isothermal amplification detection by sequence-based barcodes coupled with nicking endonuclease-mediated pyrosequencing // Anal. Chem. – 2012. – V. 84(8). – P. 3758-3763.

- 344. Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA // Nature. 1993. V.
 362. P. 709-715.
- 345. Lindahl T., Andersson A. Rate of chain breakage at apur*inic* sites in double-stranded deoxyribonucleic acid // Biochem. 1972. V.11. P. 3618-3623.
- 346. Lindahl T., Nyberg B. Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid // Biochem. –
 1972. V.11. P. 3610-3618.
- 347. Lipps G., Röther S., Hart C., Krauss G. A novel type of replicative enzyme harbouring ATPase, primase and DNA polymerase activity // EMBO J. – 2003. – V. 22(10). – P. 2516-2525.
- 348. Liu L., Vo A., McKeehan W.L. Specificity of the methylation-suppressed A isoform of candidate tumor suppressor RASSF1 for microtubule hyperstabilization is determined by cell death inducer C19ORF5 // Cancer Res. – 2005. – V. 65(5). – P. 1830-1838.
- 349. Liu L.L., Jiang D.N., Xiang G.M., Liu C., Yu J.C., Pu X.Y. Development of a cyclic voltammetry method for the detection of *Clostridium novyi* in black disease // Genet. Mol. Res. 2014. V. 13(1). P. 1724-1734.
- 350. Liu L.Q., Yin F., Lu Y., Yan X.L., Wu C.C., Li X., Li C. A light-up "G-quadruplex nanostring" for label-free and selective detection of miRNA via duplex-specific nuclease mediated tandem rolling circle amplification // Nanomedicine. – 2021. – V. 32. – 102339.
- 351. Liu R., Han H., Liu F., Lv Z., Wu K., Liu Y., Feng Y., Zhu C. Positive rate of RT-PCR detection of SARS-CoV-2 infection in 4880 cases from one hospital in Wuhan, China, from Jan to Feb 2020 // Clin. Chim. Acta. 2020. V. 505. P. 172-175.
- 352. Liu W., Huang S., Liu N., Dong D., Yang Z., Tang Y., Ma W., He X., Ao D., Xu Y., Zou D., Huang L. Establishment of an accurate and fast detection method using molecular beacons in loop-mediated isothermal amplification assay // Sci. Rep. 2017. V. 7. 40125.
- 353. Liu X.L., Zhao X.T., Muhammad I., Ge B.B., Hong B. Multiplex reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for the simultaneous detection of CVB and CSVd in chrysanthemum // J. Virol. Methods. – 2014. – V. 210. – P. 26-31.
- 354. Liu Z., Qu Z., Tang R., He X., Yang H., Bai D., Xu F. An improved detection limit and working range of lateral flow assays based on a mathematical model // Analyst. – 2018. – V. 143(12). – P. 2775-2783.
- 355. Lizardi P.M., Huang X., Zhu Z., Bray-Ward P., Thomas D.C., Ward D.C. Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification // Nat. Genet. – 1998. – V. 19(3). – P. 225-232.

- 356. Lo Y.M. Introduction to the polymerase chain reaction // Methods Mol. Med. 1998. V.
 16. P. 3-10.
- 357. Lohman G.J.S., Zhang Y., Zhelkovsky A.M., Cantor E.J., Evans Jr.T.C. Efficient DNA ligation in DNA-RNA hybrid helices by *Chlorella* virus DNA ligase // Nucleic Acids Res. - 2014. – V. 42. – P. 1831-1844.
- 358. Longo M.C., Berninger M.S., Hartley J.L. Use of uracil DNA glycosylase to control carryover contamination in polymerase chain reactions // Gene. – 1990. – V. 93(1). – P. 125-128.
- 359. Louwrier A., van der Valk A. Can sucrose affect polymerase chain reaction product formation? // Biotechnol. Lett. 2001. V. 23. P. 175-178.
- 360. Lu J., Johnston A., Berichon P., Ru K.L., Korbie D., Trau M. PrimerSuite: A High-Throughput Web-Based Primer Design Program for Multiplex Bisulfite PCR // Sci. Rep. – 2017b. – V. 7. – P. 41328.
- 361. Lu W., Wang Y., Song S., Chen C., Yao B., Wang M. A fishhook probe-based rolling circle amplification (FP-RCA) assay for efficient isolation and detection of microRNA without total RNA extraction // Analyst. – 2018. – V. 143(20). – P. 5046-5053.
- 362. Lu Y., Ma X., Wang J., Sheng N., Dong T., Song Q., Rui J., Zou B., Zhou G. Visualized detection of single-base difference in multiplexed loop-mediated isothermal amplification amplicons by invasive reaction coupled with oligonucleotide probe-modified gold nanoparticles // Biosens. Bioelectron. – 2017a. – V. 90. – P. 388-393.
- 363. Lundberg K.S., Shoemaker D.D., Adams M.W., Short J.M., Sorge J.A., Mathur E.J. Highfidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus* // Gene. – 1991. – V. 108(1). – P. 1-6.
- 364. Lung O., Reimer S.A., Goater C.P. User-friendly Taqman probe coupled-insulated isothermal PCR (iiPCR) for rapid detection of emerging *Ambystoma tigrinum* virus (ATV) in western tiger salamanders (*Ambystoma mavortium*) on a compact, portable instrument // J. Virol. Methods. – 2017. – V. 249. – P. 21-24.
- 365. Luo J., Fang X., Ye D., Li H., Chen H., Zhang S., Kong J. A real-time microfluidic multiplex electrochemical loop-mediated isothermal amplification chip for differentiating bacteria // Biosens. Bioelectron. – 2014. – V. 60. – P. 84-91.
- 366. Lyko F., Foret S., Kucharski R., Wolf S., Falckenhayn C., Maleszka R. The honeybee epigenomes: differential methylation of brain DNA in queens and workers // PLOS Biol. – 2010. – V. 8. – e1000506.

- 367. Ma C., Wang F., Wang X., Han L., Jing H., Zhang H., Shi C. A novel method to control carryover contamination in isothermal nucleic acid amplification // Chem. Commun. (Camb). 2017. V. 53(77). P. 10696-10699.
- 368. Madakashira B.P., Sadler K.C. DNA Methylation, Nuclear Organization, and Cancer // Front. Genet. – 2017. – V. 8. – e76.
- 369. Mafra I., Silva S.A., Moreira E.J., da Silva C.S.F., Beatriz M., Oliveira, P.P. Comparative study of DNA extraction methods for soybean derived food products // Food Control. – 2008. – V. 19. – P. 1183-1190.
- 370. Mahony J., Chong S., Bulir D., Ruyter A., Mwawasi K., Waltho D. Multiplex loopmediated isothermal amplification (M-LAMP) assay for the detection of influenza A/H1, A/H3 and influenza B can provide a specimen-to-result diagnosis in 40 min with single genome copy sensitivity // J. Clin. Virol. – 2013. – V. 58(1). – P. 127-131.
- 371. Maïno N., Hauling T., Cappi G., Madaboosi N., Dupouy D.G., Nilsson M. A microfluidic platform towards automated multiplexed in situ sequencing // Sci. Rep. – 2019. – V. 9. – P. 3542.
- 372. Manajit O., Longyant S., Sithigorngul P., Chaivisuthangkura P. Development of uracil-DNA-glycosylase-supplemented loop-mediated isothermal amplification coupled with nanogold probe (UDG-LAMP-AuNP) for specific detection of *Pseudomonas aeruginosa* // Mol. Med. Rep. – 2018. – V. 17(4). – P. 5734-5743.
- 373. Manen J.-F. Sinitsyna O., Aeschbach L., Markov A.V., Sinitsyn A. A fully automatable enzymatic method for DNA extraction from plant tissues // BMC Plant Biol. – 2005. – V. 5(1). – P. 23.
- 374. Mann T.L., Krull U.J. The application of ultrasound as a rapid method to provide DNA fragments suitable for detection by DNA biosensors // Biosens. Bioelectron. 2004. V. 20. P. 945-955.
- 375. Mannucci A., Sullivan K.M., Ivanov P.L., Gill P. Forensic application of a rapid and quantitative DNA sex test by amplification of the X-Y homologous gene amelogenin // Int. J. Legal Med. – 1994. – V. 106(4). – P. 190-193.
- 376. Marando M., Tamburello A., Gianella P., Taylor R., Bernasconi E., Fusi-Schmidhauser T. Diagnostic sensitivity of RT-PCR assays on nasopharyngeal specimens for detection of SARS-CoV-2 infection: A Systematic Review and Meta-Analysis // Caspian J. Intern. Med. – 2022. – V. 13. – P. 139-147.
- 377. Mardis E.R. Next-generation sequencing platforms // Ann. Rev. Anal. Chem. 2013. V.
 6. P. 287-303.

- 378. Martineau R.L., Murray S.A., Ci S., Gao W., Chao S.H., Meldrum D.R. Improved Performance of Loop-Mediated Isothermal Amplification Assays via Swarm Priming // Anal. Chem. – 2017. – V. 89(1). – P. 625-632.
- 379. Mathew C.G. The isolation of high molecular weight eukaryotic DNA // Methods Mol.
 Biol. 1985. V. 2(31). P. 31-34.
- 380. Maxam A.M., Gilbert W. A new method for sequencing DNA // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1977. – V.74. – P. 560-564.
- 381. Maxam A.M., Gilbert W. Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages // Methods enzymol. – 1980. – V. 65. – P. 499-560.
- 382. Maxeiner S., Sester M., Krasteva-Christ G. Novel human sex-typing strategies based on the autism candidate gene *NLGN4X* and its male-specific gametologue *NLGN4Y* // Biol. Sex Diff. – 2019. – V. 10(1). – e62.
- 383. McCarthy J.G. An improvement in thymine specific chemical DNA sequencing // Nucleic Acids Research. – 1989. – V. 17(18). – e7541.
- 384. McInerney P., Adams P., Hadi M.Z. Error rate comparison during polymerase chain reaction by DNA polymerase // Mol. Biol. Int. – 2014. – V. 2014. – 287430.
- 385. McNamara W.B., Didenko Y.T., Suslick K.S. Sonoluminescence temperatures during multi-bubble cavitation // Nature. – 1999. – V. 401 (6755). – P. 772-775.
- 386. Meagher R.J., Priye A., Light Y.K., Huang C., Wang E. Impact of primer dimers and selfamplifying hairpins on reverse transcription loop-mediated isothermal amplification detection of viral RNA // Analyst. – 2018. – V. 143(8). – P. 1924-1933.
- 387. Meyer S., Schröter M.-A., Hahn M.B., Solomun T., Sturm H., Kunte H.J., Ectoine can enhance structural changes in DNA in vitro // Sci. Rep. 2017. V. 7(1). P. 7170.
- 388. Millar A.A., Lohe A., Wong G. Biology and Function of miR159 in Plants // Plants (Basel). - 2019. - V. 8. - P. 255.
- 389. Miller D.L., Thomas R.M. The role of cavitation in the induction of cellular DNA damage by ultrasound and lithotripter shock waves in vitro // Ultrasound Med. Biol. – 1996. – V. 22. – P. 681-687.
- 390. Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells // Nucleic Acids Res. 1988. V. 16. e1215.
- 391. Minero G.A.S., Nogueira C., Rizzi G., Tian B., Fock J., Donolato M., Strömberg M., Hansen M.F. Sequence-specific validation of LAMP amplicons in real-time optomagnetic detection of Dengue serotype 2 synthetic DNA // Analyst. – 2017. – V. 142(18). – P. 3441-3450.

- 392. Miroshnichenko M.L., Gongadze G.M., Rainey F.A., Kostyukova A.S., Lysenko A.M., Chernyh N.A., Bonch-Osmolovskaya E.A. *Thermococcus gorgonarius* sp. nov. and *Thermococcus pacificus* sp. nov.: heterotrophic extremely thermophilic archaea from New Zealand submarine hot vents // Int. J. System. Evolut. Microbiol. – 1998. – V. 48(1). – P. 23-29.
- 393. Mitsuhashi M. Technical report: Part 2. Basic requirements for designing optimal PCR primers // J. Clin. Lab. Anal. 1996. V. 10(5). P. 285-293.
- 394. Miura F., Uematsu C., Sakaki Y., Ito T. A novel strategy to design highly specific PCR primers based on the stability and uniqueness of 3'-end subsequences // Bioinformatics. 2005. V. 21(24). P. 4363-4370.
- 395. Miyamoto S., Sano S., Takahashi K., Jikihara T. Method for colorimetric detection of double-stranded nucleic acid using leuco triphenylmethane dyes // Anal. Biochem. – 2015. – V. 473. – P. 28-33.
- 396. Mohammadi T., Reesink H.W., Vandenbroucke-Grauls C.M., Savelkoul P.H. Removal of contaminating DNA from commercial nucleic acid extraction kit reagents // J. Microbiol. Methods. – 2005. – V. 61(2). – P. 285-288.
- 397. Mohsen M.G., Kool E.T. The Discovery of Rolling Circle Amplification and Rolling Circle Transcription // Acc. Chem. Res. – 2016. – V. 49. – P. 2540-2550.
- 398. Moiseev K.V., Volkova E.V., Urmancheev S.F. Effect of Convection on Polymerase Chain Reaction in a Closed Cell // Procedia UITAM. – 2013. – V. 8. – P. 172-175.
- 399. Momin M.Y., R.R. Gaddam, M. Kravitz, A. Gupta, A. Vikram, The Challenges and Opportunities in the Development of MicroRNA Therapeutics: A Multidisciplinary Viewpoint // Cells. – 2021. – V. 10(11). – P. 3097.
- 400. Monis P.T., Giglio S., Saint C.P. Comparison of SYTO9 and SYBR Green I for real-time polymerase chain reaction and investigation of the effect of dye concentration on amplification and DNA melting curve analysis // Anal. Biochem. 2005. V. 340(1). P. 24-34.
- 401. Moore K.J.M., Cahill J., Aidelberg G., Aronoff R., Bektaş A., Bezdan D., Butler D.J. gLAMP Consortium. Loop-Mediated Isothermal Amplification Detection of SARS-CoV-2 and Myriad Other Applications // J. Biomol. Tech. 2021. V. 32(3). P. 228-275.
- 402. Moreira B.G., You Y., Owczarzy R. Cy3 and Cy5 dyes attached to oligonucleotide terminus stabilize DNA duplexes: predictive thermodynamic model // Biophys. Chem. – 2015. – V. 198. – P. 36-44.
- 403. Mori Y., Hirano T., Notomi T. Sequence specific visual detection of LAMP reactions by addition of cationic polymers // BMC Biotechnol. 2006. V.6. P. 3.

- 404. Mori Y., Kitao M., Tomita N., Notomi T. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA // J. Biochem. Biophys. Methods. 2004. V. 59(2). P. 145-57.
- 405. Mori Y., Nagamine K., Tomita N., Notomi T. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2001. – V. 289(1). – P. 150-154.
- 406. Morono Y., Yamamoto K., Inagaki F. Radical gas-based DNA decontamination for ultrasensitive molecular experiments // Microbes Environ. – 2012. – V. 27(4). – P. 512-514.
- 407. Muddu R., Hassan Y.A., Ugaz V.M. Chaotically accelerated polymerase chain reaction by microscale Rayleigh-Bénard convection // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. – 2011. – V. 50(13). – P. 3048-3052.
- 408. Mullis K., Faloona F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction // Methods Enzymol. – 1987. – V. 155. – P. 335-350.
- 409. Murakami T., Sumaoka J., Komiyama M. Sensitive isothermal detection of nucleic-acid sequence by primer generation-rolling circle amplification // Nucleic Acids Res. 2008. V. 37. e19.
- 410. Murray M.G. Thompson W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA // Nucleic Acid Res. 1980. V. 8. P. 4321-4325.
- 411. Myers T.W., Gerald D.H. Reverse transcription and DNA amplification by a *Thermus thermophilus* DNA polymerase // Biochem. 1991. V. 30(31). P. 7661-7666.
- 412. Nagamine K., Hase T., Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers // Mol. Cell. Probes. 2002. V. 16(3). P. 223-229.
- 413. Nagatani N., Yamanaka K., Saito M., Koketsu R., Sasaki T., Ikuta K., Miyahara T., Tamiya E. Semi-real time electrochemical monitoring for influenza virus RNA by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification using a USB powered portable potentiostat // Analyst. – 2011. – V. 136(24). – P. 5143-5150.
- 414. Nakahori Y., Takenaka O., Nakagome Y. A human X-Y homologous region encodes «amelogenin» // Genomics. – 1991. – V. 9(2). – P. 264-269.
- 415. Nakitandwe J., Trognitz F., Trognitz B. Reliable allele detection using SNP-based PCR primers containing Locked Nucleic Acid: application in genetic mapping // Plant Methods. 2007. V. 3. P. 2.
- 416. Nallur G., Luo C., Fang L., Cooley S., Varshal D., Lambert J., Kukanskis K., Kingsmore S., Lasken R., Schweitzer B. Signal amplification by rolling circle amplification on DNA microarrays // Nucleic Acids Res. 2001. V. 29. e118.

- 417. Nanayakkara I.A., White I.M. Demonstration of a quantitative triplex LAMP assay with an improved probe-based readout for the detection of MRSA // Analyst. 2019. V. 144(12):3878-3885.
- 418. Nechipurenko Yu.D., Golovkin M.V. Characteristics of ultrasonic cleavage of DNA // J. Struct. Chemistry. – 2009. – V.50. – P. 1007-1013.
- 419. Negri R., Costanzo G., Saladino R., Di M.E. One-step, one-lane chemical DNA sequencing by N-methylformamide in the presence of metal ions // Biotechniques. 1996. V.21 (5). P. 910-917.
- 420. Neumann J.-M., Guschlbauer W., Tran-Dinh S. Conformation and Flexibility of GpC and CpG in Neutral Aqueous Solution using 1H Nuclear Magnetic Resonance and Spin Lattice Relaxation Time Measurements // FEBS J. – 1979. – V. 100(1). – P. 141-148.
- 421. Neuner A., Jannasch H. W., Belkin S., Stetter K. O. *Thermococcus litoralis* sp. nov.: a new species of extremely thermophilic marine archaebacteria // Arch. Microbiol. 1990. V. 153(2). P. 205-207.
- 422. Nevinsky G.A. How Enzymes, Proteins, and Antibodies Recognize Extended DNAs: General Regularities // Int. J. Mol. Sci. – 2021. – V. 22(3). – 1369.
- 423. Nguyen H.V., Seo T.S. High-throughput human DNA purification on a centrifugal microfluidic device for rapid forensic sex-typing // Biosens. Bioelectron. 2021. V. 181. P. 113161.
- 424. Nicklas J.A., Buel E. Simultaneous determination of total human and male DNA using a real-time PCR assay // J. Forens. Sci. 2006, V. 51(5), P. 1005-1015.
- 425. Nieuwkerk D.M., Korajkic A., Valdespino E.L., Herrmann M.P., Harwood V.J. Critical review of methods for isothermal amplification of nucleic acids for environmental analysis // J. Microbiol. Methods. – 2020. – V. 179. – 106099.
- 426. Ning L., Wang X., Xu K., Song S., Li Q., Yang X. A novel isothermal method using rolling circle reverse transcription for accurate amplification of small RNA sequences // Biochimie. – 2019. – V. 163. – P. 137-141.
- 427. Nogami H., Tsutsumi H., Komuro T., Mukoyama R. Rapid and simple sex determination method from dental pulp by loop-mediated isothermal amplification // Forensic Sci. Int. Genet. – 2008. – V. 2(4). – P. 349-353.
- 428. Noguera D.R., Wright E.S., Camejo P., Yilmaz L.S. Mathematical tools to optimize the design of oligonucleotide probes and primers // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2014. – V. 98(23). – P. 9595-608.

- 429. Nolan T., Hands R.E., Ogunkolade W., Bustin S.A. SPUD: a quantitative PCR assay for the detection of inhibitors in nucleic acid preparations // Anal. Biochem. 2006. V. 351(2). P. 308-310.
- 430. Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA // Nucleic Acids Res. 2000. V. 28(12). e63.
- 431. Oefner P.J., Hunicke-Smith S.P., Chiang L., Dietrich F., Mulligan J., Davis R.W. Efficient random subcloning of DNA sheared in a recirculating point-sink flow system // Nucleic Acids Res. – 1996. – V. 24. – P. 3879-3886.
- 432. Ogata N., Miura T. Creation of genetic information by DNA polymerase of the archaeon *Thermococcus litoralis*: influences of temperature and ionic strength // Nucleic Acids Res.
 1998a. V. 26. P. 4652-4656.
- 433. Ogata N., Miura T. Creation of genetic information by DNA polymerase of the thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* // Nucleic Acids Res. – 1998b. – V. 26. – P. 4657-4661.
- 434. Ogata N., Miura T. Genetic information 'created' by archaebacterial DNA polymerase // Biochem. J. 1997. V. 324. P. 667-671.
- 435. Oh S.J., Park B.H., Jung J.H., Choi G., Lee D.C., Kim D.H., Seo T.S. Centrifugal loopmediated isothermal amplification microdevice for rapid, multiplex and colorimetric foodborne pathogen detection // Biosens. Bioelectron. – 2016. – V. 75. – P. 293-300.
- 436. O'Halloran D.M., Uriagereka-Herburger I., Bode K. STITCHER 2.0: primer design for overlapping PCR applications // Sci. Rep. 2017. V. 7. P. 45349.
- 437. Okabe Y., Lee A.P. LCAT DNA shearing // J. Lab. Autom. 2014. V. 19. P. 163-170.
- 438. Olkhov-Mitsel E., Bapat B. Strategies for discovery and validation of methylated and hydroxymethylated DNA biomarkers // Cancer Med. 2012. V. 1(2). P. 237-260.
- 439. Onodera K. Selection for 3'-end triplets for polymerase chain reaction primers // Methods
 Mol. Biol. 2007. V. 402. P. 61-74.
- 440. Onodera K., Melcher U. Selection for 3' end triplets for polymerase chain reaction primers // Mol. Cell. Probes. – 2004. – V. 18(6). – P. 369-372.
- 441. Opel K.L., Chung D., McCord B.R. A Study of PCR Inhibition Mechanisms Using Real Time PCR // J. Forensic Sci. – 2010. – V. 55(1). – P. 25-33.
- 442. Orlando L., Ginolhac A., Raghavan M. et al. True single-molecule DNA sequencing of a pleistocene horse bone // Genome res. 2011. V. 21 (10). P. 1705-1719.

- 443. Orlando L., Ginolhac A., Zhang G. et al. Recalibrating *Equus* evolution using the genome sequence of an early Middle Pleistocene horse // Nature. 2013. V. 499 (7456). P. 74-78.
- 444. Oscorbin I.P., Belousova E.A., Boyarskikh U.A., Zakabunin A.I., Khrapov E.A., Filipenko M.L. Derivatives of Bst-like Gss-polymerase with improved processivity and inhibitor tolerance // Nucleic Acids Res. 2017. V. 45(16). P. 9595-9610.
- 445. Oscorbin I.P., Belousova E.A., Zakabunin A.I., Boyarskikh U.A., Filipenko M.L. Comparison of fluorescent intercalating dyes for quantitative loop-mediated isothermal amplification (qLAMP) // Biotechniques. – 2016. – V. 61(1). – P. 20-25.
- 446. Oscorbin I.P., Boyarskikh U.A., Filipenko M.L. Large fragment of DNA polymerase I from *Geobacillus* sp. 777: cloning and comparison with DNA polymerases I in practical applications // Mol. Biotechnol. 2015. V. 57(10). P. 947-959.
- 447. Overballe-Petersen S., Orlando L., Willerslev E. Next generation sequencing offers new insights intoDNA degradation // Trends Biotechnol. 2012. V. 30. P. 364-368.
- 448. Paabo S. Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. P. 1939–1943.
- 449. Packer M.J., Dauncey M.P., Hunter C.A. Sequence-dependent DNA structure: dinucleotide conformational maps // J. Mol. Biol. – 2000. – V. 295. – P. 71-83.
- 450. Packer M.J., Dauncey M.P., Hunter C.A. Sequence-dependent DNA structure: tetranucleotide conformational maps // J. Mol. Biol. 2000. V. 295(1). P. 85-103.
- 451. Paez J.G., Lin M., Beroukhim R., Lee J.C., Zhao X., Richter D.J., Sellers W. R. Genome coverage and sequence fidelity of φ29 polymerase-based multiple strand displacement whole genome amplification // Nucleic Acids Res. 2004. V. 32(9). P. 71.
- 452. Page D.C., Mosher R., Simpson E.M., Fisher E.M., Mardon G., Pollack J., de la Chapelle B.M.A., Brown L.G. The sex-determ*ining* region of the human Y chromosome encodes a finger protein // Cell. – 1987. – V. 51(6). – P. 1091-1104.
- 453. Pakstis A.J., Fang R., Furtado M.R., Kidd J.R., Kidd K.K. Mini-haplotypes as lineage informative SNPs and ancestry inference SNPs // Eur. J. Hum. Genet. – 2012. – V. 20. – S. 11. – P. 1148-54.
- 454. Pan Y., MacKerell Jr.A.D. Altered structural fluctuations in duplex RNA versus DNA: a conformational switch involving base pair opening // Nucleic Acids Res. 2003. V. 31(24). P. 7131-7140.
- 455. Panaccio M., Lew A. PCR based diagnosis in the presence of 8% (v/v) blood // Nucleic Acids Res. – 1991. – V. 19(5). – P. 1151.

- 456. Pandey R.V., Pulverer W., Kallmeyer R., Beikircher G., Pabinger S., Kriegner A., Weinhäusel A. MSP-HTPrimer: a high-throughput primer design tool to improve assay design for DNA methylation analysis in epigenetics // Clin. Epigenetics. 2016. V. 8. P. 101.
- 457. Park H.C., Ahn E.R., Jung J.Y., Park J.H., Lee J.W., Lim S.K., Kim W. Enhanced sensitivity of CpG island search and primer design based on predicted CpG island position // Forensic Sci. Int. Genet. 2018. V. 34. P. 134-140.
- 458. Park J.W. Principles and Applications of Loop-Mediated Isothermal Amplification to Point-of-Care Tests // Biosensors (Basel). 2022. V. 12(10). P. 857.
- 459. Paul N., Shum J., Le T. Hot start PCR // Methods Mol. Biol. 2010. V. 630. P. 301-318.
- 460. Perler F.B., Kumar S., Kong H. Thermostable DNA polymerases // Adv. Protein Chem. 1996. V. 48. P. 377-435.
- 461. Petersen M., Ma L., Lu X. Rapid determination of viable but non-culturable *Campylobacter jejuni* in food products by loop-mediated isothermal amplification coupling propidium monoazide treatment // Int. J. Food Microbiol. – 2021. – V. 351. – 109263.
- 462. Peyrefitte C.N., Boubis L., Coudrier D., Bouloy M., Grandadam M., Tolou H.J., Plumet S. Real-time reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of rift valley Fever virus // J. Clin. Microbiol. – 2008. – V. 46(11). – P. 3653-36539.
- 463. Pinzon-Reyes E., Alvarez W.A., Rondon-Villarreal P., Hernandez H.G. Softepigen: Primers Design Web-Based Tool for MS-HRM Technique // IEEE/ACM Trans. Comput. Biol. Bioinform. – 2020. – V. 17(1). – P. 354-357.
- 464. Pirola L., Ciesielski O., Balcerczyk A. The Methylation Status of the Epigenome: Its Emerging Role in the Regulation of Tumor Angiogenesis and Tumor Growth, and Potential for Drug Targeting // Cancers (Basel). – 2018. – V. 10(8). – e268.
- 465. Poddar S.K., Sawyer M.H., Connor J.D. Effect of inhibitors in clinical specimens on Taq and Tth DNA polymerase-based PCR amplification of influenza A virus // J. Med. Microbiol. – 1998. – V. 47(12). – P. 1131-1135.
- 466. Pogorelko G.V., Fursova O.V. A highly efficient miPCR method for isolating FSTs from transgenic Arabidopsis thaliana plants // J. Genet. – 2008. – V. 87(2). – P. 133-140.
- 467. Poinar H.N., Hoss M., Bada J.L., Paabo S. Amino acid racemization and the preservation of ancient DNA // Science. 1996. V. 272. P. 864-866.
- 468. Poinar H.N., Schwarz C., Qi J. et al. Metagenomics to paleogenomics: large-scale sequencing of mammoth DNA // Science. 2006. V. 311. P. 392-394.

- 469. Poole C.B., Li Z., Alhassan A., Guelig D., Diesburg S., Tanner N.A., Zhang Y., Evans T.C. Jr., LaBarre P., Wanji S., Burton R.A., Carlow C.K. Colorimetric tests for diagnosis of filarial infection and vector surveillance using non-instrumented nucleic acid loop-mediated isothermal amplification (NINA-LAMP) // PLoS One. 2017. V. 12(2). e0169011.
- 470. Poongavanam V., Madala P.K., Højland T., Veedu R.N. Computational Investigation of Locked Nucleic Acid (LNA) Nucleotides in the Active Sites of DNA Polymerases by Molecular Docking Simulations // PLoS ONE. – 2014. – V. 9(7). – e102126.
- 471. Poptsova M.S, Il'icheva I.A., Nechipurenko D.Y., Panchenko L.A., Khodikov MV, Oparina NY, Polozov R.V., Nechipurenko Y.D., Grokhovsky S.L. Non-random DNA fragmentation in next-generation sequencing // Sci. Rep. 2014. V. 4(4532). P. 1697-1712.
- 472. Prakrankamanant P., Leelayuwat C., Promptmas C., Limpaiboon T., Wanram S., Prasongdee P., Pientong C., Daduang J., Jearanaikoon P. The development of DNA-based quartz crystal microbalance integrated with isothermal DNA amplification system for human papillomavirus type 58 detection // Biosens. Bioelectron. – 2013. – V. 40(1). – P. 252-257.
- 473. Prince A.M., Andrus L. PCR: how to kill unwanted DNA // Biotechniques. 1992. V. 12(3). P. 358-60.
- 474. Priye A., Hassan Y.A., Ugaz V.M. Microscale chaotic advection enables robust convective DNA replication // Anal. Chem. 2013. V. 85. P. 10536-10541.
- 475. Priye A., Ugaz V.M. Smartphone-Enabled Detection Strategies for Portable PCR-Based Diagnostics // Methods Mol. Biol. 2017. V. 1571. P. 251-266.
- 476. Pruvost M., Grange T., Geigl E.M. Minimizing DNA contamination by using UNGcoupled quantitative real-time PCR on degraded DNA samples: application to ancient DNA studies // Biotechniques. – 2005. – V. 38(4). – P. 569-575.
- 477. Qi H., Yue S., Bi S., Ding C., Song W. Isothermal exponential amplification techniques: From basic principles to applications in electrochemical biosensors // Biosens. Bioelectron. - 2018. – V. 110. – P. 207-217.
- 478. Qian J., Ferguson T.M., Shinde D.N., Ramírez-Borrero A.J., Hintze A., Adami C., Niemz
 A. Sequence dependence of isothermal DNA amplification via EXPAR // Nucleic Acids
 Res. 2012. V. 40. e87.
- 479. Qiu X., Zhang S., Mei L., Wu D., Guo Q., Li K., Ge S., Ye X., Xia N., Mauk M.G. Characterization and analysis of real-time capillary convective PCR toward commercialization // Biomicrofluidics. – 2017. – V.11(2). – 024103.
- 480. Qiu X.Y., Zhu L.Y., Zhu C.S., Ma J.X., Hou T., Wu X.M., Xie S.S., Min L., Tan D.A., Zhang D.Y., Zhu L. Highly Effective and Low-Cost MicroRNA Detection with CRISPR-Cas9 // ACS Synth. Biol. – 2018. – V. 7(3). – P. 807-813.
- 481. Quyen T.L., Ngo T.A., Bang D.D., Madsen M., Wolff A. Classification of Multiple DNA Dyes Based on Inhibition Effects on Real-Time Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): Prospect for Point of Care Setting // Front. Microbiol. – 2019. – V. 10. – 2234.
- 482. Ralec C., Henry E., Lemor M., Killelea T., Henneke G. Calcium-driven DNA synthesis by a high-fidelity DNA polymerase // Nucleic Acids Res. 2017. V. 45. P. 12425-12440.
- 483. Rand K.H., Houck H. Taq polymerase contains bacterial DNA of unknown origin // Mol.
 Cell. Probes. 1990. V. 4(6). P. 445-450.
- 484. Ravi Kumara G.S., Pandith A., Seo Y.J. Highly fluorescent morpholine naphthalimide deoxyuridine nucleotide for the detection of miRNA 24-3P through rolling circle amplification // Analyst. – 2020. – V. 145(14). – P. 4777-4781.
- 485. Ravina, Kumar A., Manjeet, Twinkle, Subodh, Narang J., Mohan H. Analytical performances of different diagnostic methods for SARS-CoV-2 virus - A review // Sens. Int. – 2022. – V. 3. – 100197.
- 486. Reinders J., Vivier C.D., Theiler G., Chollet D., Descombes P., Paszkowski J. Genomewide, high-resolution DNA methylation profiling using bisulfite-mediated cytosine conversion // Genome Res. – 2008. – V.18(3). – P. 469-476.
- 487. Reysenbach A.L., Giver L.J., Wickham G.S., Pace N.R. Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction // Appl. Environ. Microbiol. 1992. V. 58(10). P. 3417-3418.
- 488. Richterich P., Lakey N.D., Lee H.M., Mao J.I., Smith D., Church G.M. Cytosine specific DNA sequencing with hydrogen peroxide // Nucleic Acids Res. – 1995. – V. 23(23). – P. 4922.
- 489. Rifai N., Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics / 6-th ed. St. Louis: Saunders Elsevier. 2017. 1888 p.
- 490. Rogers J.C. Identification of an intracellular precursor to DNA excreted by human lymphocytes // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1976. V. 73(9). P. 3211-3215.
- 491. Rohland N., Hofreiter M. Ancient DNA extraction from bones and teeth // Nature Protocols. 2007a. V. 2(7). P. 1756-1762.
- 492. Rohland N., Hofreiter M. Comparison and optimization of ancient DNA extraction // Biotechniques. – 2007b. – V. 42. – P. 343-352.

- 493. Rohland N., Pollack J.L., Nagel D., Beauval C., Airvaux J., Pääbo S., Hofreiter M. The population history of extant and extinct hyenas // Mol. Biol. Evol. – 2005. – V. 22(12). – P. 2435-2443.
- 494. Rolando J.C., Jue E., Barlow J.T., Ismagilov R.F. Real-time kinetics and high-resolution melt curves in single-molecule digital LAMP to differentiate and study specific and nonspecific amplification // Nucleic Acids Res. – 2020. – V. 48(7). – e42.
- 495. Rollins R.A., Haghighi F., Edwards J.R., Das R., Zhang M.Q., Ju J., Bestor T.H. Largescale structure of genomic methylation patterns // Genome Res. – 2006. – V. 16(2). – P. 157-163.
- 496. Rowther F.B., Rodrigues C., Mehta A.P., Deshmukh M.S., Kapadia F.N., Hegde A., Joshi V.R. An improved method of elimination of DNA from PCR reagents // Mol. Diagn. 2005. V. 9(2). P. 53-57.
- 497. Roy S., Mohd-Naim N.F., Safavieh M., Ahmed M.U. Colorimetric Nucleic Acid Detection on Paper Microchip Using Loop Mediated Isothermal Amplification and Crystal Violet Dye // ACS Sens. – 2017. – V. 2(11). – P. 1713-1720.
- 498. Rubin C.M., Schmid C.W. Pyrimidine-specific chemical reactions useful for DNA sequencing // Nucleic Acids Res. 1980. V. 8(20). P. 4613-4620.
- 499. Rueckert A., Morgan H.W. Removal of contaminating DNA from polymerase chain reaction using ethidium monoazide // J. Microbiol. Methods. – 2007. – V. 68(3). – P. 596-600.
- 500. Ruggiero V.J., Benitez O.J., Tsai Y.L., Lee P.A., Tsai C.F., Lin Y.C., Chang H.G., Wang H.T., Bartlett P. On-site detection of bovine leukemia virus by a field-deployable automatic nucleic extraction plus insulated isothermal polymerase chain reaction system // J. Virol. Methods. 2018. V. 259. P.116-121.
- 501. Rychlik W. Selection of primers for polymerase chain reaction // Methods Mol. Biol. 1993. V. 15. P. 31-40.
- 502. Sadeghi Y., Kananizadeh P., Moghadam S.O., Alizadeh A., Pourmand M.R., Mohammadi N., Afshar D., Ranjbar R. The Sensitivity and Specificity of Loop-Mediated Isothermal Amplification and PCR Methods in Detection of Foodborne Microorganisms: A Systematic Review and Meta-Analysis // Iran J. Public Health. 2021. V. 50(11). P. 2172-2182.
- 503. Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia // Science. – 1985. – V. 230(4739). – P. 1350-1354.

- 504. Saliminejad K., Khorram Khorshid H.R., Soleymani Fard S., Ghaffari S.H. An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods // J. Cell. Physiol. – 2019. – V. 234(5). – P. 5451-5465.
- 505. Sambrook J., Russell D.W. Fragmentation of DNA by nebulization // CSH Protoc. 2006.
 V. 2006(4). pdb. prot4539.
- 506. Sambrook J., Russell D.W. Isolation of DNA fragments from polyacrylamide gels by the crush and soak method // CSHarb. Protoc. 2006. V. 2006(1). –pdb.prot2936.
- 507. SantaLucia J. A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearestneighbor thermodynamics // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1998. – V. 95(4). – P. 1460-1465.
- 508. Santos F.R., Pandya A., Tyler-Smith C. Reliability of DNA-based sex tests // Nature Genet. - 1998. - V. 18(2). - P. 103.
- 509. Sappat A., Jaroenram W., Puthawibool T., Lomas T., Tuantranont A., Kiatpathomchai W. Detection of shrimp Taura syndrome virus by loop-mediated isothermal amplification using a designed portable multi-channel turbidimeter // J. Virol. Methods. 2011. V. 175(2). P. 141-148.
- 510. Sarkar G., Sommer S.S. Removal of DNA contamination in polymerase chain reaction reagents by ultraviolet irradiation // Methods Enzymol. 1993. V. 218. P. 381-388.
- 511. Sarkar G., Sommer S.S. Shedding light on PCR contamination // Nature. 1990. V. 343(6253). P. 27.
- 512. Sasaki N., Kase C., Chou M., Nakazato G., Sato K. Mechanistic investigation of beadbased padlock rolling circle amplification under molecular crowding conditions // Anal. Biochem. – 2020. – V. 593. – P. 113596.
- 513. Sastry G.M., Adzhigirey M., Day T., Annabhimoju R., Sherman W. Protein and ligand preparation: Parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments// J. Comput. Aid. Mol. Des. – 2013. – V. 27. – P. 221-234.
- 514. Satterfield B.C. Cooperative primers: 2.5-million-fold improvement in the reduction of nonspecific amplification // J. Mol. Diagn. 2014. V. 16(2). P. 163-173.
- 515. Schneider L., Blakely H., Tripathi A. Mathematical model to reduce loop mediated isothermal amplification (LAMP) false-positive diagnosis // Electrophoresis. – 2019. – V. 40(20). – P. 2706-2717.
- 516. Scholz M., Giddings I., Pusch C.M. A polymerase chain reaction inhibitor of ancient hard and soft tissue DNA extracts is determined as human collagen type I // Anal. Biochem. – 1998. – V. 259. – P. 283-286.

- 517. Schrader C., Schielke A., Ellerbroek L., Johne R. PCR inhibitors occurrence, properties and removal // J. Appl. Microbiol. 2012. V. 113(5). P. 1014-1026.
- 518. Scott A., Jackson K., Carter M., Comeau R., Layne T., Landers J. Rapid sperm lysis and novel screening approach for human male DNA via colorimetric loop-mediated isothermal amplification // Forensic Sci. Int. Genet. – 2019. – V. 43. – 102139.
- 519. Seetang-Nun Y., Jaroenram W., Sriurairatana S., Suebsing R., Kiatpathomchai W. Visual detection of white spot syndrome virus using DNA-functionalized gold nanoparticles as probes combined with loop-mediated isothermal amplification // Mol. Cell. Probes. 2013. V. 27(2). P. 71-79.
- 520. Sellins K.S., Cohen J.J. Gene induction by γ-irradiation leads to DNA fragmentation in lymphocytes // J. Immunol. 1987. V. 139. P. 3199-3206.
- 521. Seyrig G., Stedtfeld R.D., Tourlousse D.M., Ahmad F., Towery K., Cupples A.M., Tiedje J.M., Hashsham S.A. Selection of fluorescent DNA dyes for real-time LAMP with portable and simple optics // J. Microbiol. Methods. 2015. V. 119. P. 223-227.
- 522. Shaik G.M. Dráberová L., Dráber P., Boubelík M., Dráber P. Tetraalkylammonium derivatives as real-time PCR enhancers and stabilizers of the qPCR mixtures conta*ining* SYBR Green I // Nucleic Acids Res. – 2008. – V. 36(15). – e93.
- 523. Shao Y., Zhu S., Jin C., Chen F. Development of multiplex loop-mediated isothermal amplification-RFLP (mLAMP-RFLP) to detect *Salmonella* spp. and *Shigella* spp. in milk // Int. J. Food Microbiol. – 2011. – V. 148(2). – P. 75-79.
- 524. Shapiro B., Drummond A. J., Rambaut A. et al. Rise and fall of the *Beringian steppe bison* // Science. 2004. V. 306(5701). P. 1561-1565.
- 525. Sharma A., Balda S., Apreja V., Kataria K., Capalash N., Sharma P. COVID-19 Diagnosis: Current and Future Techniques // Int. J. Biol. Macromol. - 2021. – V. 193. – P. 1835-1844.
- 526. Shekhtman E.M. Anne K., Melkonyan H.S., Robbins D.J., Warsof S.L., Umansky S.R. Optimization of transrenal DNA analysis: detection of fetal DNA in maternal urine // Clin. chem. – 2009. – V. 55(4). – P. 723-729.
- 527. Shi D., Huang J., Chuai Z., Chen D., Zhu X., Wang H., Peng J., Wu H., Huang Q., Fu W. Isothermal and rapid detection of pathogenic microorganisms using a nano-rolling circle amplification-surface plasmon resonance biosensor // Biosens. Bioelectron. – 2014. – V. 62. – P. 280-287.
- 528. Shu B., Zhang C., Xing D. A sample-to-answer, real-time convective polymerase chain reaction system for point-of-care diagnostics // Biosens. Bioelectron. – 2017. – V. 97. – P. 360-368.

- 529. Shui L., Bomer J.G., Jin M., Carlen E.T., Berg A. Microfluidic DNA fragmentation for onchip genomic analysis // Nanotechnol. – 2011. – V. 22 (49). – 494013.
- 530. Silber R., Malathi V.G., Hurwitz J. Purification and properties of bacteriophage T4-induced RNA ligase // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1972. – V. 69(10). – P. 3009-3013.
- 531. Silkie S.S., Tolcher M.P., Nelson K.L. Reagent decontamination to eliminate false positives in Escherichia coli qPCR // J. Microbiol. Methods. – 2008. – V. 72(3). – P. 275-82.
- 532. Silva A., Azevedo M., Sampaio-Maia B., Sousa-Pinto B. The effect of mouthrinses on severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 viral load: A systematic review // J. Am. Dent. Assoc. – 2022. – V. 153. – P. 635-648.
- 533. Sina A.A., Carrascosa L.G., Palanisamy R., Rauf S., Shiddiky M.J., Trau M. Methylsorb: a simple method for quantifying DNA methylation using DNA-gold aff*inity* interactions // Anal. Chem. – 2014. – V. 86(20). – P. 10179-10185.
- 534. Snopek T.J., Sugino A., Agarwal K.L., Cozzarelli N.R. Catalysis of DNA joining by bacteriophage T4 RNA ligase // Biochem. Biophys. Res. Comm. – 1976. – V. 68(2). – P. 417-424.
- 535. Snyder M.W., Adey A., Kitzman J.O., Shendure J. Haplotype-resolved genome sequencing: experimental methods and applications // Nature Rev. Genet. – 2015. – V. 16(6). – P. 344-358.
- 536. Soares S., Amaral J.S., Oliveira M.B.P., Mafra I. Improving DNA isolation from honey for the botanical origin identification // Food Control. 2015. V. 48. P. 130-136.
- 537. Soltan M.A., Tsai Y.L., Lee P.A., Tsai C.F., Chang H.G., Wang H.T., Wilkes R.P. Comparison of electron microscopy, ELISA, real time RT-PCR and insulated isothermal RT-PCR for the detection of Rotavirus group A (RVA) in feces of different animal species // J. Virol. Methods. 2016. V.235. P. 99-104.
- 538. Sommer R., Tautz D. Minimal homology requirements for PCR primers // Nucleic Acids Res. - 1989. - V. 17(16). - e6749.
- 539. Sørensen E., Hansen S.H., Eriksen B., Morling N. Application of thiopropyl sepharose 6B for removal of PCR inhibitors from DNA extracts of a thigh bone recovered from the sea // Int. J. Legal. Med. 2003. V. 117(4). P. 245-247.
- 540. Soroka M., Wasowicz B., Rymaszewska A. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): The Better Sibling of PCR? // Cells. – 2021. – V. 10(8). – P. 1931.
- 541. Spiess A.N., Mueller N., Ivell R. Trehalose is a potent PCR enhancer: lowering of DNA melting temperature and thermal stabilization of Taq polymerase by the disaccharide trehalose // Clin. Chem. 2004. V. 50(7). P. 1256-1259.

- 542. Steitz T.A. A mechanism for all polymerases // Nature. 1998. V. 391(6664). P. 231-232.
- 543. Strerath M, Marx A. Tuning PCR specificity by chemically modified primer probes // Angew Chem. Int. Ed. Engl. 2002. V. 41(24). P. 4766-4769.
- 544. Strerath M., Detmer I., Gaster J., Marx A. Modified oligonucleotides as tools for allelespecific amplification // Methods Mol. Biol. – 2007. – V. 402. – P. 317-328.
- 545. Stroun M., Anker P., Lyautey J. Isolation and characterization of DNA from the plasma of cancer patients // Tur. J. Cancer Clin. Oncol. – 1987. – V. 23 (6). – P. 707-712.
- 546. Stroun M., Anker P., Maurice P. Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients // Oncology. 1989. V. 46. P. 318-322.
- 547. Su C., Teng P-H., Jeng C-C. Method for steadying thermal convection flow field in solution during thermal convective polymerase chain reaction / US Patent No 2016/0244810 A1. 25.08.2016.
- 548. Sugino A., Snoper T.J., Cozzarelli N.R. Bacteriophage T4 RNA ligase. Reaction intermediates and interaction of substrates // J. Biol. Chem. – 1977. – V. 252(5). – P. 1732-1738.
- 549. Summerton J., Stein D., Huang S.B., Matthews P., Weller D., Partridge M. Morpholino and phosphorothioate antisense oligomers compared in cell-free and in-cell systems // Antisense Nucleic Acid Drug Dev. – 1997. – V. 7. – P. 63-70.
- 550. Sun Y., Tian H., Liu C., Sun Y., Li Z. One-step detection of microRNA with high sensitivity and specificity via target-triggered loop-mediated isothermal amplification (TT-LAMP) // Chem. Commun. (Camb). – 2017. – V. 53(80). – P. 11040-11043.
- 551. Sur K., McFall S.M., Yeh E.T., Jangam S.R., Hayden M.A., Stroupe S.D., Kelso D.M. Immiscible phase nucleic acid purification eliminates PCR inhibitors with a single pass of paramagnetic particles through a hydrophobic liquid // J. Mol. Diagn. – 2010. – V. 12(5). – P. 620-628.
- 552. Suslick K.S., Price G.J. Applications of ultrasound to materials chemistry // Ann. Rev. Mater. Sci. – 1999. – V. 29(1). – P. 295-326.
- 553. Suzuki M.M., Bird A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics // Nat. Rev. Genet. 2008. V. 9(6). P. 465-476.
- 554. Takayama I., Nakauchi M., Takahashi H., Oba K., Semba S., Kaida A., Kubo H., Saito S., Nagata S., Odagiri T., Kageyama T. Development of real-time fluorescent reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay with quenching primer for influenza virus and respiratory syncytial virus // J. Virol. Methods. – 2019. – V. 267. – P. 53-58.

- 555. Tallmadge R.L., Laverack M., Cronk B., Venugopalan R., Martins M., Zhang X., Elvinger F., Plocharczyk E., Diel D.G. Viral RNA Load and Infectivity of SARS-CoV-2 in Paired Respiratory and Oral Specimens from Symptomatic, Asymptomatic, or Postsymptomatic Individuals // Microbiol. Spectr. 2022. V. 10. e0226421.
- 556. Tan Y., Wang L., Wang H., Tian H., Li Z., Wang Q., Jian H., Cao S., Liang W., Zhang L. An investigation of a set of DIP-STR markers to detect unbalanced DNA mixtures among the southwest Chinese Han population // Forensic Sci. Int. Genet. – 2017. – V. 31. – P. 34-39.
- 557. Tang X., Wang Y., Zhou L., Zhang W., Yang S., Yu L., Zhao S., Chang K., Chen M. Strand displacement-triggered G-quadruplex/rolling circle amplification strategy for the ultra-sensitive electrochemical sensing of exosomal microRNAs // Mikrochim. Acta. 2020. V. 187(3). 172.
- 558. Tani H., Teramura T., Adachi K., Tsuneda S., Kurata S., Nakamura K., Kanagawa T., Noda N. Technique for quantitative detection of specific DNA sequences using alternately binding quenching probe competitive assay combined with loop-mediated isothermal amplification // Anal. Chem. 2007. – V. 79(15). – P. 5608-5613.
- 559. Tanner N.A., Zhang Y., Evans T.C.Jr. Simultaneous multiple target detection in real-time loop-mediated isothermal amplification // Biotechniques. – 2012. – V. 53(2). – P. 81-89.
- 560. Tanner N.A., Zhang Y., Evans T.C.Jr. Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using pH-sensitive dyes // Biotechniques. 2015. V. 58(2). P. 59-68.
- 561. Taylor W.H., Hagerman P.J. Application of the method of phage T4 DNA ligase-catalyzed ring-closure to the study of DNA structure: II. NaCl-dependence of DNA flexibility and helical repeat // J. Mol. Biol. – 1990. – V. 212(2). – P. 363-376.
- 562. Techathuvanan C., D'Souza D.H. Propidium monoazide for viable Salmonella enterica detection by PCR and LAMP assays in comparison to RNA-based RT-PCR, RT-LAMP, and culture-based assays // J. Food Sci. – 2020. – V. 85(10). – P. 3509-3516.
- 563. Teixeira A., Paris J.L., Roumani F., Diéguez L., Prado M., Espiña B., Abalde-Cela S., Garrido-Maestu A., Rodriguez-Lorenzo L. Multifuntional Gold Nanoparticles for the SERS Detection of Pathogens Combined with a LAMP-in-Microdroplets Approach // Materials (Basel). – 2020. – V. 13(8). – 1934.
- 564. Telli A.E., Doğruer Y. Discrimination of viable and dead Vibrio parahaemolyticus subjected to low temperatures using Propidium Monoazide - Quantitative loop mediated isothermal amplification (PMA-qLAMP) and PMA-qPCR // Microb. Pathog. – 2019. – V. 132. – P. 109-116.

- 565. Templeton J.E. Brotherton P.M., Llamas B., Soubrier J., Haak W., Cooper A., Austin J.J. DNA capture and next-generation sequencing can recover whole mitochondrial genomes from highly degraded samples for human identification // Inv. Genet. 2013. V. 4(1). P. 26.
- 566. Terpe K. Overview of thermostable DNA polymerases for classical PCR applications: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2013. – V. 97(24). – P. 10243-10254.
- 567. Thornton C.G., Passen S. Inhibition of PCR amplification by phytic acid, and treatment of bovine fecal specimens with phytase to reduce inhibition // J. Microbiol. Methods. 2004.
 V. 59(1). P. 43-52.
- 568. Thorstenson Y.R., Hunicke-Smith S.P., Oefner P.J., Davis R.W. An automated hydrodynamic process for controlled, unbiased DNA shearing // Genome Res. – 1998. – V. 8. – P. 848-855.
- 569. Tian B., Minero G.A.S., Fock J., Dufva M., Hansen M.F. CRISPR-Cas12a based internal negative control for nonspecific products of exponential rolling circle amplification // Nucleic Acids Res. – 2020b. – V. 48(5). – e30.
- 570. Tian W., Liu X., Wang G., Liu C. A hyperbranched transcription-activated CRISPR-Cas12a signal amplification strategy for sensitive microRNA sensing // Chem. Commun. (Camb). – 2020a. – V. 56(87). – P. 13445-13448.
- 571. Tomita N., Mori Y., Kanda H., Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products // Nat. Protoc. 2008.
 V. 3(5). P. 877-882.
- 572. Tone K., Fujisaki R., Yamazaki T., Makimura K. Enhancing melting curve analysis for the discrimination of loop-mediated isothermal amplification products from four pathogenic molds: Use of inorganic pyrophosphatase and its effect in reducing the variance in melting temperature values // J. Microbiol. Methods. 2017. V. 132. P. 41-45.
- 573. Travers A.A. The structural basis of DNA flexibility // Philos. Trans. Roy. Soc. A. 2004.
 V. 362. P. 1423-1438.
- 574. Trieu P.T., Lee N.Y. Paper-Based All-in-One Origami Microdevice for Nucleic Acid Amplification Testing for Rapid Colorimetric Identification of Live Cells for Point-of-Care Testing // Anal. Chem. – 2019. – V. 91(17). – P. 11013-11022.
- 575. Tsai M.-D. Catalytic mechanism of DNA polymerases Two metal ions or three? // Protein Sci. - 2019. - V. 28. - P. 288-291.
- 576. Tseng Q., Lomonosov A.M., Furlong E.E., Merten C.A. Fragmentation of DNA in a submicroliter microfluidic sonication device // Lab. Chip. – 2012. – V. 12. – P. 4677-4682.

- 577. Turner S.L., Jenkins F.J. Use of deoxyinosine in PCR to improve amplification of GC-rich DNA // Biotechniques. – 1995. – V. 19(1). – P. 48-52.
- 578. Uhlenbeck O.C., Gimport R.I. The enzyme (T4 RNA Ligase). Academic Press. Inc. 1982.
- 579. Untergasser A., Cutcutache I., Koressaar T., Ye J., Faircloth B.C., Remm M., Rozen S.G. Primer3 new capabilities and interfaces // Nucleic Acids Res. 2012. V. 40(15). e115.
- 580. Vajpayee K., Dash H.R., Parekh P.B., Shukla R.K. PCR inhibitors and facilitators Their role in forensic DNA analysis // Forensic Sci. Int. 2023. V. 349. 111773.
- 581. van Doorn R., Klerks M.M., van Gent-Pelzer M.P., Speksnijder A.G., Kowalchuk G.A., Schoen C.D. Accurate quantification of microorganisms in PCR-inhibiting environmental DNA extracts by a novel internal amplification control approach using Biotrove OpenArrays // Appl. Environ. Microbiol. – 2009. – V. 75(22). – P. 7253-7260.
- 582. Vandesompele J., De Paepe A., Speleman F. Elimination of primer-dimer artifacts and genomic coamplification using a two-step SYBR green I real-time RT-PCR // Anal. Biochem. – 2002. – V. 303(1). – P. 95-98.
- 583. Varona M., Anderson J.L. Visual Detection of Single-Nucleotide Polymorphisms Using Molecular Beacon Loop-Mediated Isothermal Amplification with Centrifuge-Free DNA Extraction // Anal. Chem. – 2019. – V. 91(11). – P. 6991-6995.
- 584. Vashishtha A.K., Konigsberg W.H. Effect of different divalent cations on the kinetics and fidelity of *Bacillus stearothermophilus* DNA polymerase // Biochemistry. – 2018. – V. 55(2). – P. 2661-2670.
- 585. Vashishtha A.K., Wang J., Konigsberg W.H. Different Divalent Cations Alter the Kinetics and Fidelity of DNA Polymerases // J. Biol. Chem. – 2016. – V. 291(40). – P. 20869-20875.
- 586. Veedu R.N., Vester B., Wengel J. Efficient enzymatic synthesis of LNA-modified DNA duplexes using KOD DNA polymerase // Org. Biomol. Chem. – 2009. – V. 7. – P. 1404-1409.
- 587. Veigas B., Branquinho R., Pinto J.V., Wojcik P.J., Martins R., Fortunato E., Baptista P.V. Ion sensing (EIS) real-time quantitative monitorization of isothermal DNA amplification // Biosens. Bioelectron. – 2014. – V. 52. – P. 50-55.
- 588. Verna R., Alallon W., Murakami M. et al. Analytical Performance of COVID-19 Detection Methods (RT-PCR): Scientific and Societal Concerns // Life (Basel). – 2021. – V. 11. – e660.

- 589. Vindeirinho J.M., Pinho E., Azevedo N.F., Almeida C. SARS-CoV-2 diagnostics based on nucleic acids amplification: from fundamental concepts to applications and beyond // Front. Cell. Infect. Microbiol. – 2022. – V. 12. – e799678.
- 590. Vologodskaia M., Vologodskii A. Contribution of the intrinsic curvature to measured DNA persistence length // J. Mol. Biol. 2002. V. 317. P. 205-213.
- 591. von Hippel P.H., Johnson N.P., Marcus A.H. 50 years of DNA 'Breathing': Reflections on Old and New Approaches // Biopolymers. – 2013. – V. 99. – P. 923-954.
- 592. Walsh P.S., Metzger D.A., Higuchi R. Chelex 100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR-Based Typing from Forensic Material // Biotechniques. 1991. V. 10(4). P. 506-513.
- 593. Wang D. Effect of internal primer-template mismatches on loop-mediated isothermal amplification // Biotechnol. Biotechnol. Equip. 2016. V. 2. P. 314-318.
- 594. Wang D.G., Brewster J.D., Paul M., Tomasula P.M. Two methods for increased specificity and sensitivity in loop-mediated isothermal amplification // Molecules. 2015. V. 20(4). P. 6048-6059.
- 595. Wang S., Liu N., Zheng L., Cai G., Lin J. A lab-on-chip device for the sample-in-result-out detection of viable *Salmonella* using loop-mediated isothermal amplification and real-time turbidity monitoring // Lab. Chip. – 2020. – V. 20(13). – P. 2296-2305.
- 596. Wang Y., Yang Q., Gao Z., Dong H., Recent advance of RNA aptamers and DNAzymes for MicroRNA detection // Biosens. Bioelectron. 2022. V. 212. 114423.
- 597. Wang, G., Ding, X., Hu, J., Wu, W., Sun, J., and Mu, Y. Unusual isothermal multimerization and amplification by the strand-displacing DNA polymerases with reverse transcription activities // Sci. Rep. 2017. V. 7. P. 13928.
- 598. Waters D.L., Shapter F.M. The polymerase chain reaction (PCR): general methods // Methods Mol. Biol. 2014. V. 1099. P. 65-75.
- 599. Whitaker J.P., Clayton T.M., Urquhart A.J., Millican E.S., Downes T.J., Kimpton C.P., Gill P. STR typing of bodies from the scene of a mass disaster: High success rate and characteristic amplification patterns in highly degraded samples // Biotechniques. 1995. V. 18. P. 670-677.
- 600. Widom J. Role of DNA sequence in nucleosome stability and dynamics // Q. Rev. Biophys.
 2001. V. 34. P. 269-324.
- 601. Wiedbrauk D.L., Werner J.C., Drevon A.M. Inhibition of PCR by aqueous and vitreous fluids // J. Clin. Microbiol. 1995. V. 33(10). P. 2643-2646.

- 602. Wiggins P.A., Heijden T.V.D., Monero-Herrero F. High flexibility of DNA on short length scales probed by atomic force microscopy // Nature Nanotechnol. – 2006. – V. 1(2). – P. 137-141.
- 603. Wilkes R.P., Anis E., Dunbar D., Lee P.A., Tsai Y.L., Lee F.C., Chang H.G., Wang H.T., Graham E.M. Rapid and sensitive insulated isothermal PCR for point-of-need feline leukaemia virus detection. // J. Feline Med. Surg. – 2018. – V. 20(4). – P. 362-369.
- 604. Wilson I.G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification // Appl. Environ. Microbiol. – 1997. – V. 63. – P. 3741-3751.
- 605. Wong J.K., Yip S.P., Lee T.M. Ultrasensitive and closed-tube colorimetric loop-mediated isothermal amplification assay using carboxyl-modified gold nanoparticles // Small. – 2014. – V. 10(8). – P. 1495-1499.
- 606. Wong Y.P., Othman S., Lau Y.L., Radu S., Chee H.Y. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms // J. Appl. Microbiol. – 2018. – V. 124(3). – P. 626-643.
- 607. Wu D.Y., Ugozzoli L., Pal B.K., Qian J., Wallace R.B. The effect of temperature and oligonucleotide primer length on the specificity and efficiency of amplification by the polymerase chain reaction // DNA Cell. Biol. 1991. V. 10(3). P. 233-238.
- 608. Wu D.Y., Ugozzoli L., Pal B.K., Wallace R.B. Allele-specific enzymatic amplification of beta-globin genomic DNA for diagnosis of sickle cell anemia // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1989. – V. 86. – P. 2757-2760.
- 609. Wu E.Y., Beese L.S. The structure of a high fidelity DNA polymerase bound to a mismatched nucleotide reveals an "ajar" intermediate conformation in the nucleotide selection mechanism // J. Biol. Chem. 2011. V. 286(22). P. 19758-19767.
- 610. Wu P.Y., Ho L.C., Chang J.J., Tzeng K.C., Deng W.L., Lin Y.H. Development of a TaqMan probe-based insulated isothermal PCR (TiiPCR) for the detection of *Acidovorax citrulli*, the bacterial pathogen of watermelon fruit blotch // Eur. J. Plant Pathol. 2017. V. 147(4). P. 869–875.
- 611. Xiao J. (Ed.), MicroRNA: From Bench to Bedside / 1st ed., Academic Press. –2022. 654 p.
- 612. Xie S., Zhu Q., Qu W. et al. sRNAPrimerDB: comprehensive primer design and search web service for small non-coding RNAs // Bioinformatics. – 2019. – V. 35(9). – P. 1566-1572.
- 613. Xie X., Zhong Z., Zhao W., Zheng C., Wang F., Liu J. Chest CT for Typical Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Pneumonia: Relationship to Negative RT-PCR Testing // Radiology. – 2020. – V. 296. – 200343.

- 614. Xu X., Zhang B., Gan P., Wu J., Dai W., Zhang L., Wang J. On-nylon membrane detection of nucleic acid molecules by rolling circle amplification // Anal. Biochem. – 2017. – V. 533. – P. 26–33.
- 615. Xu Y., Kool E.T. A Novel 5'-Iodonucleoside Allows Efficient Nonenzymatic Ligation of Single-stranded and Duplex DNAs // Tetrahedron Lett. 1997. V. 38. P. 5595-5598.
- 616. Yamanaka E.S., Tortajada-Genaro L.A., Pastor N., Maquieira Á. Polymorphism genotyping based on loop-mediated isothermal amplification and smartphone detection // Biosens. Bioelectron. – 2018. – V. 109. – P. 177-183.
- 617. Yang W., Weng P.J., Gao Y. A new paradigm of DNA synthesis: three-metal-ion catalysis // Cell Biosci. – 2016. – V. 6(1). – e51.
- 618. Yao D.J., Chen J.R., Ju W.T. Micro-Rayleigh-Benard convection polymerase chain reaction systems // J. Micro/Nanolith. MEMS MOEMS. – 2007. – V. 6(4). – 043007-1-043007-9.
- 619. Yaren O., Glushakova L.G., Bradley K.M., Hoshika S., Benner S.A. Standard and AEGIS nicking molecular beacons detect amplicons from the Middle East respiratory syndrome coronavirus // J. Virol. Methods. 2016. V. 236. P. 54-61.
- 620. Yaylak B., Akgül B. Experimental MicroRNA Detection Methods // Methods Mol. Biol. 2022. V. 2257. P. 33-55.
- 621. Ye J., Xu M., Tian X., Cai S., Zeng S. Research advances in the detection of miRNA // J. Pharm. Anal. 2019. V. 9(4). P. 217-226.
- 622. Yi J., Zhang W., Zhang D.Y. Molecular Zipper: a fluorescent probe for real-time isothermal DNA amplification // Nucleic Acids Res. 2006. V. 34(11). e81.
- 623. Yoshii T., Tamura K., Taniguchi T., Akiyama K., Ishiyama I. Water-soluble eumelanin as a PCR-inhibitor and a simple method for its removal // Japan J. Legal Med. 1993. V. 47(4). P. 323-329.
- 624. Yue S., Li Y., Qiao Z., Song W., Bi S. Rolling Circle Replication for Biosensing, Bioimaging, and Biomedicine // Trends Biotechnol. 2021. V. 39. P. 1160-1172.
- 625. Zhang D., Gao B., Zhao C., Liu H. Visualized Quantitation of Trace Nucleic Acids Based on the Coffee-Ring Effect on Colloid-Crystal Substrates // Langmuir. – 2019. – V. 35(1). – P. 248-253.
- 626. Zhang D.Y., Brandwein M., Hsuih T., Li H.B. Ramification amplification: a novel isothermal DNA amplification method // Mol. Diagn. 2001. V. 6. P. 141-150.
- 627. Zhang D.Y., Brandwein M., Hsuih T.C., Li H. Amplification of target-specific, ligationdependent circular probe // Gene. – 1998. – V. 211(2). – P. 277-285.

- 628. Zhang L., Kang M., Xu J., Huang Y. Archaeal DNA polymerases in biotechnology // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2015. – V. 99. – P. 6585-6597.
- 629. Zhang Y., Zhang Y., Chen Z. et al. A novel point-of-care test of respiratory syncytial viral RNA based on cellulose-based purification and convective PCR // Clin. Chim. Acta. – 2020. – V. 511. – P. 154-159.
- 630. Zhang Z., Yang X., Meng L., Liu F., Shen C., Yang W. Enhanced amplification of GC-rich DNA with two organic reagents // Biotechniques. 2009. V. 47(3). P. 775-779.
- 631. Zhang Z.P., Zhang Y., Liu J.P., Zhang J.T., An Z.X., Quan F.S., Zhang L., Cai X., Pu S.W. Codeposition of dNTPs detection for rapid LAMP-based sexing of bovine embryos // Reprod. Domest. Anim. – 2009. – V. 44(1). – P. 116-121.
- 632. Zhao Y., Wang Y., Liu S., Wang C., Liang J., Li S., Qu X., Zhang R., Yu J., Huang J. Triple-helix molecular-switch-actuated exponential rolling circular amplification for ultrasensitive fluorescence detection of miRNAs // Analyst. – 2019. – V. 144(17). – P. 5245-5253.
- 633. Zheleznaya L.A., Kossykh V.G., Svad'bina I.V., Oshman T.S., Matvienko N.I. PCR fragmentation of DNA // Biochemistry (Mosc). 1999. V. 64. P. 373-378.
- 634. Zhi X., Deng M., Yang H., Gao G., Wang K., Fu H., Zhang Y., Chen D., Cui D. A novel HBV genotypes detecting system combined with microfluidic chip, loop-mediated isothermal amplification and GMR sensors // Biosens. Bioelectron. – 2014. – V. 54. – P. 372-377.
- 635. Zhong J., Zhao X. Isothermal Amplification Technologies for the Detection of Foodborne Pathogens // Food Anal. Method. 2018. V. 11(6). P. 1543-1560.
- 636. Zhu L., Xu Y., Cheng N., Xie P., Shao X., Huang K., Luo Y., Xu W. A facile cascade signal amplification strategy using DNAzyme loop-mediated isothermal amplification for the ultrasensitive colorimetric detection of Salmonella // Sens. Act. B: Chem. 2017. V. 242. P. 880-888.
- 637. Zhu Q., Gao Y., Yu B., Ren H., Qiu L., Han S., Jin W., Jin Q., Mu Y. Self-priming compartmentalization digital LAMP for point-of-care // Lab. Chip. 2012. V. 12(22). P. 4755-4763.
- 638. Zhu Y.S., Isaacs S.T., Cimino C.D., Hearst J.E. The use of exonuclease III for polymerase chain reaction sterilization // Nucleic Acids Res. 1991. V. 19(9). e2511.
- 639. Zoheir K.M., Allam A.A. A rapid method for sexing the bovine embryo // Anim. Reprod.
 Sci. 2010. V. 119(1-2). P. 92-96.
- 640. Zou B., Li J., Zhou Q., Quan Z.X. MIPE: A metagenome-based community structure explorer and SSU primer evaluation tool // PLoS One. 2017. V. 12(3). e0174609.

- 641. Zyrina N.V., Antipova V.N., Zheleznaya L.A. Ab *ini*tio synthesis by DNA polymerases // FEMS Microbiol. Lett. 2014. V. 351(1. P. 1-6.
- 642. Zyrina, N.V., Zheleznaya L.A., Dvoretsky E.V., Vasiliev V.D., Chernov A. N.BspD6I DNA nickase strongly stimulates template independent synthesis of non-palindromic repetitive DNA by Bst DNA polymerase // Biol. Chem. – 2007. – V. 388(4). – P. 367-372.
- 643. Ахрем А.А., Андреюк Г.М., Кисель М.А. Способ определения концентрации гемоглобина в крови / Пат. СССР №1386901. 1986.
- 644. Баймиев Ан.Х., Баймиев Ал.Х., Кулуев Б.Р. и др. Современные подходы к дифференциации живых и мертвых бактерий с помощью избирательной амплификации нуклеиновых кислот // Микробиол. 2020. Т. 89(1). С. 17-33.
- 645. Белохвостов А.С. Экстрахромосомные ДНК в клетках млекопитающих // Усп. совр. биол. – 1997. – Т. 177. – С. 433-441.
- 646. Бодулев О.Л., Сахаров И.Ю. Изотермические методы амплификации нуклеиновых кислот и их применение в биоанализе // Биохимия. 2020. Т. 85(2). С. 174-196.
- 647. Гарафутдинов Р.Р., Никоноров Ю.М., Чемерис Д.А., Постригань Б.Н., Чубукова О.В., Талипов Р.Ф., Вахитов В.А., Чемерис А.В. Новые способы генерации сигнала флуоресценции при анализе однонуклеотидных замен с помощью химерных гибридизационных зондов в реальном времени // Биоорган. химия. – 2009. – Т. 35. – С. 665-673.
- 648. Головкин М.В. Нечипуренко Д.Ю., Ильичева И.А. Математические методы анализа электрофоретических картин расщепления ДНК // Комп. иссл. модел. – 2009. – Т. 1(3). – С. 287-295.
- 649. ГОСТ Р 19792-2001 "Мёд натуральный. Технические условия", М.: Стандартинформ, 2011, 18 с.
- 650. ГОСТ Р 52451-2005 "Мёд монофлорный. Технические условия", М.: Стандартинформ, 2007, 12 с.
- 651. Гроховский С.Л. Специфичность расщепления ДНК ультразвуком // Мол. Биол. 2006. Т. 40. С. 317-325.
- 652. Гроховский С.Л., Ильичева И.А., Нечипуренко Д.Ю. и др. Локальные неоднородности структуры и динамики двуспиральной ДНК: исследование при помощи ультразвука // Биофизика. 2008. Т. 53. С. 417-425.
- 653. Зырина Н.В., Антипова В.Н. Неспецифический синтез нуклеиновых кислот в реакциях изотермической амплификации // Биохимия. 2021. Т. 86(7). С. 1066-1077.

- 654. Курманов Р.Г., Ишбирдин А.Р. Мелиссопалинология. Уфа: Башкирский государственный университет, 2014. 128 с.
- 655. Ребриков Д.В., Трофимов Д.Ю., Саматов Г.А. ПЦР в реальном времени. М.: Лаборатория знаний. – 2023. – 223 с.
- 656. Свердлов Е.Д., Калинина Н.Ф. Взаимодействие ДНК с перекисью водорода. Метод локализации пиримидиновых оснований в ДНК // Биоорг. Химия. – 1983. – Т. 9. – С. 1696-1698.
- 657. Устинов А.В., Степанова И.А., Дубнякова В.В., Зацепин Т.С., Ножевникова Е.В., Коршун В.А. Модификация нуклеиновых кислот с помощью реакции [3+2]-диполярного циклоприсоединения азидов и алкинов // Биоорг. Химия. 2010. Т. 36. С. 437-481.
- 658. Хафизов К.Ф., Петров В.В., Красовитов К.В., Золкина М.В., Акимкин В.Г. Экспрессдиагностика новой коронавирусной инфекции с помощью реакции петлевой изотермической амплификации // Вопросы вирусол. – 2021. – Т. 66(1). – С. 17-28.
- 659. Чемерис А.В., Аминев Ф.Г., Гарафутдинов Р.Р., Анисимов В.А., Сагитов А.М., Хуснутдинова Э.К., Сахабутдинова А.Р., Чемерис Д.А., Михайленко К.И. ДНКкриминалистика. – Москва: Наука, 2022. – 466 с.
- 660. Чемерис А.В., Магданов Э.Г., Гарафутдинов Р.Р., Вахитов В.А. Как исключить появление ложно-позитивных результатов при проведении полимеразной цепной реакции // Вестн. биотехнол. физ.-хим. биол. – 2012. – Т. 8. – С. 34-45.

ПРИЛОЖЕНИЕ.

Дополнительные материалы и некоторые экспериментальные данные.



Рис. II1. Оценка полноты метилирования ДНК λ: дорожка 1 – метилированная ДНК, обработанная рестриктазой HpaII, 2 – неметилированная ДНК, обработанная рестриктазой HpaII, М – маркер 100 п.о.

Таблица П1. Нуклеотидные последовательности из генома фага Лямбда, использованные при оценке влияния метилирования на

УЗ-фрагментацию ДНК.

Область (ампликон)	Последовательность, 5' → 3'	Праймеры*	Длина, п.о.
L1	<u>GAGGTGATAAAATTAACTGCTTAACTGTCAATG</u> TAATACAAGTTGTTTGATCTTTGCAATGAT TCTTATCAGAAACCATATAGTAAATTAGTTACACAGGAAATTTTTAATATTATTATTATCATTC ATTATGTATTAAAATTAGA <u>GTTGTGGCTTGGCTCTGCTAA</u>	phL F1 + phL R4	167
L2	<u>TGGGACTCCTGGCTGATTAAGTATGT</u> CGATAAGGCGTTTCCATCCGTCACGTAATTTACGGGT GATTCGTTCAAGTAAAGATTCGGAAGGGCAGCCAGCAACAGGCCACCCTGCAAT <u>GGCATATT</u> <u>GCATGGTGTGCTCC</u>	phL F7 + phL R2	139
L3	<u>GCGTAAGGCGTGGGATGTG</u> CTCAGCGATTTCTGCTCGGCGATGCGCTGTATGCCGGTATGGA ACGGGCAGACGCTGACGTTCGTGCAGGACCGACCGTCGGATAAGACGTGGACCTATAACCGC AGTAATGTGGTG <u>ATGCCGGATGATGGCGCG</u>	phL F3 + phL R3	154
L4	<u>CTGTTCTTGCGGTTTGGAGGAATTG</u> ATTCAAATTCAAGCGAAATAATTCAGGGTCAAAATATG TATCAATGCAGCATTTGAGCAAGTGCGATAAATCTTTAAGTCTTCTTTCCCATGGTTTTTTAGT CATAAAACTCTCCATTTTGATAGGTTGCATGCTAGATGCTGATATATTTTA <u>GAGGTGATAAAA</u> <u>TTAACTGCTTAACTGTCAATG</u> TAATACAAGTTGTTTGATCTTTGCAATGATTCTTATCAGAAAC CATATAGTAAATTAGTTACACAGGAAATTTTTAATATTATTATCATTCAT	phL F4 + phL R4	345
L5	<u>GATGCAGGTAGCCAGTGAGCATATTG</u> CGCCGCTTCAGGATGCTGCAGATCTGGAAATTGCAA	phL F5 + phL R5	356

	CGAAGGAAGAAACCTCGTTGCTGGAAGCCTGGAAGAAGTATCGGGTGTTGCTGAACCGTGTT		
	GATACATCAACTGCACCTGATATTGAGTGGCCTGCTGTCCCTGTTATGGAGTAATCGTTTTGT		
	GATATGCCGCAGAAACGTTGTATGAAATAACGTTCTGCGGTTAGTTA		
	AGTATTGGTTTATTTGGCGATTATTATCTTCAGGAGAATAATGGAAGTTCTATGACTCAATTG		
	TTCATAGTGTTTACAT <u>CACCGCCAATTGCTTTTAAGACTGAAC</u>		
L6	<u>GATCAGCAGCCTGACGGATG</u> CGGTGTCCGGCGACAGCCTGACTGCCCAGGAGGCACTCGCGA	phL F6 + phL R6	349
	CGCTGGCATTATCCGGTGATGATGACGGACCACGACAGGCCCGCAGTTATCAGGTCATGAAC		
	GGCATCGCCGTGCTGCCGGTGTCCGGCACGCTGGTCAGCCGGACGCGGGCGCTGCAGCCGTA		
	CTCGGGGATGACCGGTTACAACGGCATTATCGCCCGTCTGCAACAGGCTGCCAGCGATCCGA		
	TGGTGGACGGCATTCTGCTCGATATGGACACGCCCGGCGGGGATGGTGGCGGGGGGCATTTGAC		
	TGCGCTGACATCATCGC <u>CCGTGTGCGTGACATAAAACCG</u>		
L7	TGGGACTCCTGGCTGATTAAGTATGTCGATAAGGCGTTTCCATCCGTCACGTAATTTACGGGT	phL F7 + phL R7	499
L7	<u>TGGGACTCCTGGCTGATTAAGTATGT</u> CGATAAGGCGTTTCCATCCGTCACGTAATTTACGGGT GATTCGTTCAAGTAAAGATTCGGAAGGGCAGCCAGCAACAGGCCACCCTGCAATGGCATATT	phL F7 + phL R7	499
L7	<u>TGGGACTCCTGGCTGATTAAGTATGT</u> CGATAAGGCGTTTCCATCCGTCACGTAATTTACGGGT GATTCGTTCAAGTAAAGATTCGGAAGGGCAGCCAGCAACAGGCCACCCTGCAATGGCATATT GCATGGTGTGCTCCTTATTTATACATAACGAAAAACGCCTCGAGTGAAGCGTTATTGGTATGC	phL F7 + phL R7	499
L7	TGGGACTCCTGGCTGATTAAGTATGTGATTCGTTCAAGTAAAGATTCGGAAGGGCAGCCAGCAACAGGCCACCCTGCAATGGCATATTGCATGGTGTGCTCCTTATTTATACATAACGAAAAACGCCTCGAGTGAAGCGTTATTGGTATGCGGTAAAACCGCACTCAGGCGGCCTTGATAGTCATATCATCTGAATCAAATATTCCTGATGTAT	phL F7 + phL R7	499
L7	TGGGACTCCTGGCTGATTAAGTATGTGATTCGTTCAAGTAAAGATTCGGAAGGGCAGCCAGCAACAGGCCACCCTGCAATGGCATATTGCATGGTGTGCTCCTTATTTATACATAACGAAAAACGCCTCGAGTGAAGCGTTATTGGTATGCGGTAAAACCGCACTCAGGCGGCCTTGATAGTCATATCATCTGAATCAAATATTCCTGATGTATCGATATCGGTAATTCTTATTCCTTCGCTACCATCCATTGGAGGCCATCCTTCCT	phL F7 + phL R7	499
L7	TGGGACTCCTGGCTGATTAAGTATGTCGATAAGGCGTTTCCATCCGTCACGTAATTTACGGGT GATTCGTTCAAGTAAAGATTCGGAAGGGCAGCCAGCAACAGGCCACCCTGCAATGGCATATT GCATGGTGTGCTCCTTATTTATACATAACGAAAAACGCCTCGAGTGAAGCGTTATTGGTATGC GGTAAAACCGCACTCAGGCGGCCTTGATAGTCATATCATCTGAATCAAATATTCCTGATGTAT CGATATCGGTAATTCTTATTCCTTCGCTACCATCCATTGGAGGCCATCCTTCCT	phL F7 + phL R7	499
L7	TGGGACTCCTGGCTGATTAAGTATGTCGATAAGGCGTTTCCATCCGTCACGTAATTTACGGGT GATTCGTTCAAGTAAAGATTCGGAAGGGCAGCCAGCAACAGGCCACCCTGCAATGGCATATT GCATGGTGTGCTCCTTATTTATACATAACGAAAAAACGCCTCGAGTGAAGCGTTATTGGTATGC GGTAAAACCGCACTCAGGCGGCCTTGATAGTCATATCATCTGAATCAAATATTCCTGATGTAT CGATATCGGTAATTCTTATTCCTTCGCTACCATCCATTGGAGGCCATCCTTCCT	phL F7 + phL R7	499
L7	TGGGACTCCTGGCTGATTAAGTATGTCGATAAGGCGTTTCCATCCGTCACGTAATTTACGGGTGATTCGTTCAAGTAAAGATTCGGAAGGGCAGCCAGCAACAGGCCACCCTGCAATGGCATATTGCATGGTGTGCTCCTTATTTATACATAACGAAAAACGCCTCGAGTGAAGCGTTATTGGTATGCGGTAAAACCGCACTCAGGCGGCCTTGATAGTCATATCATCTGAATCAAATATTCCTGATGTATCGATATCGGTAATTCTTATTCCTTCGCTACCATCCATTGGAGGCCATCCTTCCT	phL F7 + phL R7	499
L7	TGGGACTCCTGGCTGATTAAGTATGTCGATAAGGCGTTTCCATCCGTCACGTAATTTACGGGT GATTCGTTCAAGTAAAGATTCGGAAGGGCAGCCAGCAACAGGCCACCCTGCAATGGCATATT GCATGGTGTGCTCCTTATTTATACATAACGAAAAACGCCTCGAGTGAAGCGTTATTGGTATGC GGTAAAACCGCACTCAGGCGGCCTTGATAGTCATATCATCTGAATCAAATATTCCTGATGTAT CGATATCGGTAATTCTTATTCCTTCGCTACCATCCATTGGAGGCCATCCTTCCT	phL F7 + phL R7	499
L7 L8	TGGGACTCCTGGCTGATTAAGTATGTCGATAAGGCGTTTCCATCCGTCACGTAATTTACGGGTGATTCGTTCAAGTAAAGATTCGGAAGGGCAGCCAGCAACAGGCCACCCTGCAATGGCATATTGCATGGTGTGCTCCTTATTTATACATAACGAAAAACGCCTCGAGTGAAGCGTTATTGGTATGCGGTAAAACCGCACTCAGGCGGCCTTGATAGTCATATCATCTGAATCAAATATTCCTGATGTATCGATATCGGTAATTCTTATTCCTTCGCTACCATCCATTGGAGGCCATCCTTCCT	phL F7 + phL R7 phL F8 + phL R8	499 480
L7 L8	TGGGACTCCTGGCTGATTAAGTATGTCGATAAGGCGTTTCCATCCGTCACGTAATTTACGGGTGATTCGTTCAAGTAAAGATTCGGAAGGGCAGCCAGCAACAGGCCACCCTGCAATGGCATATTGCATGGTGTGCTCCTTATTTATACATAACGAAAAACGCCTCGAGTGAAGCGTTATTGGTATGCGGTAAAACCGCACTCAGGCGGCCTTGATAGTCATATCATCTGAATCAAATATTCCTGATGTATCGATATCGGTAATTCTTATTCCTTCGCTACCATCCATTGGAGGCCATCCTTCCT	phL F7 + phL R7 phL F8 + phL R8	499 480

L9ATGCGCTGTATGCCGGTATGGAACGGGCAGACGCTGACGTTCGTGCAGGACCGACC		TCTCGGTAACTGCATATTCTGCATTAAAAAATCAACGCAAAAAATCGGACTTGCCTGCAAAG ATGAGGAGGGATTGCAGCGTGTTTTTAATGAGGTCATCACGGGATCCCATGTGCGTGACGGA CATCGGGAAACGCCAAAGGAGATTATGTACCGAGGAAGAATGTCGCTGGACGGTATCGCGA AAATGTATTCAGAAAATGATTATCAAGCCCTGTATCAGGACATGGTACGAGCTAAAAGATTC GATACCGGCTCTTGTTCTGAGTCATG <u>CGAAATATTTGGAGGGCAGCT</u>		
	L9	ATGCGCTGTATGCCGGTATGGAACGGGCAGACGCTGACGTTCGTGCAGGACCGACC	phL F9 + phL R9	461

* указаны названия праймеров, использованные для амплификации соответствующего локуса. Последовательности, соответствующие участкам отжига праймеров, подчеркнуты.

тринуклеотид		sst			dst	
(порядок						
N3N2N1)	1L3S	2HVI	1LV5	1L3S	2HVI	1LV5
AAA	-5,010	-4,881	-7,176	-6,585	-4,451	-4,592
AAC	-6,910	-6,374	-7,524	-6,751	-3,115	-6,289
AAG	-6,600	-6,067	-7,162	-5,308	-5,247	-8,920
AAT	-7,380	-7,229	-7,292	-3,753	-5,656	-7,423
ACA	-7,088	-7,987	-7,204	-6,466	-6,109	-9,459
ACC	-6,402	-7,053	-7,445	-6,504	-8,285	-9,911
ACG	-7,026	-7,784	-7,161	-5,941	-5,351	-9,361
ACT	-6,912	-7,445	-8,170	-6,558	-8,733	-9,219
AGA	-6,227	-6,540	-7,251	-8,617	-5,860	-6,117
AGC	-7,054	-6,460	-7,605	-6,303	-7,475	-5,776
AGG	-7,572	-4,204	-8,480	-6,713	-4,565	-10,329
AGT	-5,851	-6,428	-7,643	-4,884	-6,967	-5,280
ATA	-5,902	-8,232	-7,169	-6,702	-5,471	-3,223
ATC	-6,017	-6,945	-8,353	-7,082	-7,212	-6,137
ATG	-6,095	-8,157	-7,870	-4,625	-5,061	-4,545
ATT	-7,449	-7,860	-7,699	-6,642	-7,167	-1,626
CAA	-6,023	-7,451	-6,989	-7,443	-4,043	-6,114
CAC	-8,147	-5,860	-7,022	-3,255	-7,087	-3,971
CAG	-6,272	-6,213	-6,179	-5,229	-5,743	-6,095
CAT	-5,779	-7,269	-6,982	-6,393	-4,536	-7,335
CCA	-7,169	-9,011	-10,743	-6,438	-7,907	-9,838
CCC	-6,948	-9,575	-9,536	-7,341	-7,421	-10,034
CCG	-6,125	-9,694	-7,015	-5,679	-7,915	-10,022
ССТ	-5,708	-8,874	-9,811	-3,820	-7,829	-10,043
CGA	-5,918	-7,152	-7,468	-6,007	-7,649	-9,298
CGC	-5,983	-6,585	-6,925	-4,108	-6,947	-9,571
CGG	-4,436	-5,392	-6,914	-5,257	-7,662	-10,119
CGT	-6,067	-7,356	-7,193	-3,257	-3,925	-5,506
СТА	-7,008	-9,444	-8,371	-8,188	-3,294	-10,969
СТС	-7,066	-8,911	-10,610	-6,308	-5,887	-6,381
CTG	-6,432	-6,703	-7,179	-5,789	-5,011	-6,600
СТТ	-5,723	-9,109	-9,509	-6,590	-5,064	-4,097
GAA	-6,440	-7,183	-7,606	-7,937	-7,628	-7,354
GAC	-6,791	-7,086	-7,865	-6,215	-7,522	-6,139
GAG	-6,726	-8,785	-7,212	-6,373	-5,235	-6,759

Таблица П2. Значения *docking score*, полученные для комплексов полимеразы Bst exo- с модельными ДНК (*).

GAT	-7,115	-7,521	-6,868	-6,915	-4,884	-4,806
GCA	-5,015	-6,809	-6,640	-6,739	-7,044	-9,926
GCC	-6,300	-6,928	-7,362	-6,658	-7,406	-4,841
GCG	-4,463	-7,108	-7,874	-5,807	-2,470	-9,628
GCT	-6,175	-7,129	-7,709	-5,028	-6,964	-4,541
GGA	-4,596	-5,480	-8,001	-8,033	-7,685	-5,318
GGC	-5,664	-2,451	-7,886	-7,186	-7,994	-7,772
GGG	-5,271	-3,935	-7,203	-5,887	-6,939	-8,030
GGT	-7,244	-6,403	-7,920	-8,348	-7,547	-6,616
GTA	-6,506	-8,716	-7,409	-8,373	-4,951	-6,771
GTC	-6,305	-7,161	-6,890	-7,243	-8,070	-6,879
GTG	-4,853	-8,901	-7,354	-4,685	-7,196	-7,786
GTT	-6,396	-7,296	-7,679	-7,248	-6,458	-4,856
TAA	-6,552	-8,164	-7,196	-7,417	-4,589	-6,585
TAC	-6,799	-6,638	-7,309	-6,228	-6,995	-5,102
TAG	-5,608	-8,353	-6,875	-5,499	-4,727	-8,494
TAT	-6,896	-7,177	-6,844	-1,944	-5,360	-3,993
TCA	-3,150	-9,054	-10,502	-7,346	-7,976	-9,848
TCC	-7,368	-6,988	-9,321	-6,056	-3,564	-3,713
TCG	-4,471	-10,116	-7,616	-6,257	-7,313	-10,628
TCT	-7,358	-9,050	-9,911	-3,912	-7,567	-10,399
TGA	-6,471	-5,615	-7,104	-7,692	-6,285	-6,306
TGC	-6,055	-5,017	-7,073	-4,650	-8,228	-3,752
TGG	-6,403	-5,106	-6,946	-6,733	-5,607	-3,774
TGT	-6,011	-8,575	-8,562	-5,415	-6,965	-3,832
TTA	-4,876	-8,821	-11,485	-7,268	-3,332	-4,870
TTC	-6,572	-9,049	-8,670	-6,176	-6,412	-3,092
TTG	-7,477	-10,413	-7,744	-7,162	-3,500	-9,705
TTT	-6,963	-9,350	-11,067	-5,509	-6,658	-8,361
минимальное						
значение MIN	-8,147	-10,413	-11,485	-8,617	-8,733	-10,969
максимальное						
значение МАХ	-3,150	-2,451	-6,179	-1,944	-2,470	-1,626
среднее						
значение	-6,043	-7,045	-7,571	-5,966	-6,024	-6,666
SD	0,923	1,562	1,169	1,347	1,547	2,382
Δ (MAX-MIN)	4,997	7,962	5,306	6,673	6,263	9,343

* жирным шрифтом выделены значения *docking score*, максимальные в своих группах (четверках тринуклеотидов).

			S	st			dst								
	1L	3S	2H	VI	1L	V5	1L	3S	2H	VI	1L	V5			
динуклеотид, 3'-	docking														
5' (N3N2)	score	SD													
AA	-6,475	1,028	-6,138	0,971	-7,289	0,167	-5,599	1,389	-4,617	1,120	-6,806	1,827			
AC	-6,857	0,312	-7,567	0,409	-7,495	0,467	-6,367	0,287	-7,120	1,644	-9,488	0,299			
AG	-6,676	0,781	-5,908	1,137	-7,745	0,521	-6,629	1,540	-6,217	1,291	-6,876	2,328			
AT	-6,366	0,727	-7,799	0,591	-7,773	0,489	-6,263	1,109	-6,228	1,123	-3,883	1,919			
CA	-6,555	1,080	-6,698	0,781	-6,793	0,428	-5,580	1,794	-5,352	1,359	-5,879	1,398			
CC	-6,488	0,687	-9,289	0,406	-9,276	1,695	-5,820	1,496	-7,768	0,235	-9,984	0,098			
CG	-5,601	0,779	-6,621	0,882	-7,125	0,282	-4,657	1,217	-6,546	1,779	-8,624	2,106			
СТ	-6,557	0,625	-8,542	1,245	-8,917	1,557	-6,719	1,034	-4,814	1,090	-7,012	2,871			
GA	-6,768	0,277	-7,644	0,783	-7,388	0,438	-6,860	0,778	-6,317	1,460	-6,265	1,092			
GC	-5,488	0,895	-6,994	0,153	-7,396	0,547	-6,058	0,806	-5,971	2,342	-7,234	2,941			
GG	-5,694	1,124	-4,567	1,740	-7,753	0,369	-7,364	1,100	-7,541	0,443	-6,934	1,240			
GT	-6,015	0,779	-8,019	0,917	-7,333	0,328	-6,887	1,561	-6,669	1,321	-6,573	1,232			
ТА	-6,464	0,589	-7,583	0,814	-7,056	0,428	-5,272	2,355	-5,418	1,104	-6,044	0,428			
TC	-5,587	2,121	-8,802	1,309	-9,338	1,695	-5,893	1,437	-6,605	2,046	-8,647	1,695			
TG	-6,235	0,236	-6,078	1,685	-7,421	0,282	-6,123	1,355	-6,771	1,118	-4,416	0,282			
TT	-6,472	1,127	-9,408	0,704	-9,742	1,557	-6,529	0,839	-4,976	1,805	-6,507	1,557			
MIN	-6,857		-9,408		-9,742		-7,364		-7,768		-9,984				
MAX	-5,488		-4,567		-6,793		-4,657		-4,617		-3,883				
среднее значение	-6,173		-6,988		-8,268		-6,011		-6,193		-6,934				
SD	0,449		1,326		0,916		0,687		0,940		1,634				
Δ (MAX-MIN)	1,369		4,841		2,949		2,707		3,151		6,101				

Таблица ПЗ. Средние значения *docking score* при рассмотрении только ключевых нуклеотидов (центрального, N2, как связанного с 3'-концевым нуклеотидом растущей цепи, и N3 (5'-концевого)) *.

* красным шрифтом выделены значения docking score, максимальные в своих группах (четверках динуклеотидов).

Таблица П4. Энергетические параметры, количество и тип химических связей, образованных трифосфатом (дЦТФ), ДНКполимеразой Bst exo- (PDB: 1LV5), ДНК, катионами и молекулами воды.

Поло	жени								Связ	ывание триф	осфата с:				Связывание H ₂ O с:			Общее		
е кат	иона	Энергети	ческие пај	оаметры				амино	кислот	ами		кати	онам							индекс
		П								_]	a de la companya de la compa	нинс	дЦТ	A TC		Н	Ион-	связы-
А	В	Потенци- альная	docking	glide	Arg	Gln	Ile	Glu	His	Arg 702	Lvs 706	А	В	днк	Φ	АК	ДНК	связи	ные связи	вания R
		энергия	score	emodel	615	656	657	658	682	8										
Ca	Ca	-2754,8	-13,404	-132,495	1 H	1 H	1 H	1 H	1 H	2 sb	2 sb	1 sb	4 sb	3 H + 2 π-π	3 H	2 H	1 H	14	9	23
Ca	Cd	-2760,2	-10,554	-172,222		1 H	1 H		1 H	2 sb	2 sb	1 sb	4 sb	3 H + 2 π-π	3 H	2 H	1 H	12	9	21
Ca	Co	-2760,4	-13,653	-153,500		1 H	1 H		1 H	1 H + 2 sb	3 sb	1 sb	4 sb	3 H + 2 π-π	3 H	2 H	1 H	13	10	23
Ca	Cu	-2760,4	-11,873	-169,529		1 H	1 H	1 H	1 H	2 sb	3 sb	1 sb	4 sb	3 H + 1 π-π	3 H	2 H	1 H	13	10	23
Ca	Mg	-2761,017	-10,468	-191,692		1 H	1 H		1 H	2 sb	1 H + 3 sb	1 sb	4 sb	3 H + 2 π-π	3 H	2 H	1 H	13	10	23
Ca	Mn	-2760,435	-10,796	-175,556		1 H	1 H		1 H	2 sb	1 H + 3 sb	1 sb	4 sb	3 H + 2 π-π	3 H	2 H	1 H	13	10	23
Ca	Ni	-2760,414	-11,315	-244,798		1 H				2 H + 2 sb	4 sb	2 sb	3 sb	3 H + 2 π-π	2 H	1 H	1 H	10	11	21
Ca	Zn	-2760,854	-10,195	-256,765		1 H	1 H	1 H	1 H	2 sb	3 sb	1 sb	4 sb	3 H + 2 π-π	3 H	2 H	1 H	13	10	23
Cd	Ca	-2761,327	-13,283	-176,465		1 H	1 H	1 H	1 H	2 sb	3 sb	1 sb	4 sb	3 H + 2 π-π	3 H	2 H	1 H	13	10	23
Cd	Cd	-2751,903	-14,699	-167,137	1 H		1 H		1 H	1 H +1 sb	3 sb	2 sb	4 sb	3 H + 2 π-π	3 H	2 H	1 H	13	10	23
Cd	Co	-2758,729	-15,425	-177,182		1 H	1 H	1 H	1 H	1 H +1 sb	3 sb	2 sb	4 sb	3 H + 2 π-π	2 H	2 H		12	10	22
Cd	Cu	-2758,933	-15,020	-169,641		1 H	1 H		1 H	1 H +1 sb	3 sb	1 sb	4 sb	3 H + 2 π-π	3 H	2 H	1 H	13	9	22
Cd	Mg	-2760,138	-14,616	-190,113		1 H	1 H	1 H	1 H	2 sb	2 sb	1 sb	4 sb	3 H + 2 π-π	3 H	2 H	1 H	13	9	22
Cd	Mn	-2759,017	-13,695	-164,174		1 H		1 H		2 sb	2 sb	1 sb	4 sb	3 H + 2 π-π	3 H	2 H	1 H	11	9	20
Cd	Ni	-2759,002	-11,115	-261,086		1 H		1 H		2 H + 1 sb	3 sb	1 sb	2 sb	$3 H + 2 \pi - \pi$	2 H	1 H	1 H	11	7	18
Cd	Zn	-2759,817	-12,734	-299,601	1 H			1 H		1 H +1 sb	1 H + 3 sb	1 sb	4 sb	$3 H + 2 \pi - \pi$	3 H	2 H	1 H	13	9	22
Со	Ca	-2761,402	-15,045	-172,764		1 H	1 H	1 H	1 H	2 sb	2 sb	1 sb	4 sb	3 H + 2 π-π	2 H	2 H		11	9	20
Co	Cd	-2759,043	-15,086	-170,407		1 H	1 H		1 H	1 H + 1 sb	1 H + 3 sb	2 sb	4 sb	3 H + 2 π-π	3 H	2 H	1 H	14	10	24

Co	Co	-2759,089	-15,742	-171,832		1 H	1 H		1 H	2 sb	2 sb	1 sb	4 sb	3 H + 2 π-π	3 H	2 H	1 H	12	9	21
Со	Cu	-2759,175	-14,563	-165,880		1 H	1 H		1 H	1 H +1 sb	1 H + 2 sb	1 sb	4 sb	3 H + 2 π-π	3 H	2 H	1 H	14	8	22
Со	Mg	-2760,150	-14,940	-179,882	1 H	1 H	1 H		1 H	2 sb	2 sb	1 sb	4 sb	3 H + 2 π-π	3 H	2 H	1 H	13	9	22
Со	Mn	-2759,118	-13,830	-177,349		1 H	1 H		1 H	2 sb	2 sb	1 sb	4 sb	3 H + 2 π-π	3 H	2 H	1 H	12	9	21
Со	Ni	-2759,108	-12,829	-294,608	1 H					1 H +1 sb	1 H + 2 sb	1 sb	4 sb	3 H + 2 π-π	3 H	2 H	1 H	12	8	20
Со	Zn	-2759,908	-12,535	-324,081	1 H		1 H	1 H	1 H	1 H +1 sb	1 H + 3 sb	1 sb	4 sb	3 H + 2 π-π	3 H	2 H	1 H	15	9	24
Cu	Ca	-2742,302	-14,255	-196,373		1 H	1 H		1 H	1 H + 2 sb	1 H + 3 sb	1 sb	4 sb	3 H + 2 π-π	3 H	2 H	1 H	14	10	24
Cu	Cd	-2757,518	-15,442	-189,664		1 H	1 H		1 H	2 sb	3 sb	1 sb	4 sb	3 H + 2 π-π	3 H	2 H	1 H	12	10	22
Cu	Co	-2757,657	-15,470	-170,079		2 H		1 H	1 H	2 sb	2 sb	1 sb	4 sb	3 H + 2 π-π	3 H	2 H	1 H	13	9	22
Cu	Cu	-2757,612	-14,938	-198,117		1 H	1 H		1 H	1 H + 2 sb	3 sb	1 sb	4 sb	3 H + 2 π-π	3 H	2 H	1 H	13	10	23
Cu	Mg	-2758,378	-10,466	-254,488		1 H		1 H		2 H + 2 sb	4 sb	2 sb	3 sb	3 H + 2 π-π	2 H	1 H	1 H	11	11	22
Cu	Mn	-2757,645	-15,371	-173,488			1 H	1 H	1 H	2 sb	2 sb	1 sb	4 sb	3 H + 2 π-π	3 H	2 H	1 H	12	9	21
Cu	Ni	-2757,662	-11,496	-269,814	1 H	2 H			1 H	1 H +1 sb	3 sb	2 sb	4 sb	1 H + 1 π-π	2 H	1 H	1 H	10	10	20
Cu	Zn	-2758,193	-12,853	-298,672	1 H					2 sb	2 sb	1 sb	4 sb	3 H + 2 π-π	3 H	2 H	1 H	10	9	19
Mg	Ca	-2765,108	-13,039	-175,300				1 H	1 H	1 H +1 sb	3 sb	2 sb	4 sb	3 H + 2 π-π	3 H	2 H	1 H	12	10	22
Mg	Cd	-2763,203	-12,843	-201,032		1 H	1 H		1 H	1 H +1 sb	3 sb	2 sb	4 sb	3 H + 2 π-π	3 H	2 H	1 H	13	10	23
Mg	Co	-2763,333	-12,606	-197,915		1 H	1 H		1 H	1 H +1 sb	3 sb	2 sb	4 sb	3 H + 2 π-π	3 H	2 H	1 H	13	10	23
Mg	Cu	-2763,292	-12,386	-189,971		1 H	1 H		1 H	2 sb	2 sb	1 sb	4 sb	3 H + 2 π-π	3 H	2 H	1 H	12	9	21
Mg	Mg	-2763,952	-11,609	-203,648		1 H	1 H	1 H	1 H	1 H +1 sb	1 H + 2 sb	2 sb	4 sb	3 H + 2 π-π	3 H	2 H	1 H	15	9	24
Mg	Mn	-2763,350	-11,580	-191,424		1 H	1 H		1 H	1 H +1 sb	1 H + 3 sb	2 sb	4 sb	3 H + 2 π-π	3 H	2 H	1 H	14	10	24
Mg	Ni	-2763,334	-12,373	-284,370				1 H		2 H + 1 sb	3 sb	1 sb	4 sb	3 H + 2 π-π	3 H	2 H	1 H	12	9	21
Mg	Zn	-2763,843	-11,282	-274,003		1 H	1 H	1 H	1 H	2 sb	3 sb	1 sb	4 sb	1 Н + 2 π-π	2 H	2 H	1 H	10	10	20
Mn	Ca	-2760,832	-15,234	-167,510		1 H	1 H	1 H	1 H	1 H + 1 sb	3 sb	2 sb	4 sb	3 H + 2 π-π	2 H	2 H		12	10	22
Mn	Cd	-2759,141	-14,995	-166,450						2 sb	2 sb	1 sb	4 sb	3 H + 2 π-π	3 H	2 H	1 H	9	9	18
Mn	Co	-2759,122	-14,279	-178,656		1 H	1 H	1 H	1 H	1 H +1 sb	1 H + 2 sb	1 sb	4 sb	3 H + 2 π-π	3 H	2 H	1 H	15	8	23
Mn	Cu	-2759,395	-14,307	-170,954		1 H	1 H		1 H	2 sb	3 sb	1 sb	4 sb	3 H + 2 π-π	3 H	2 H	1 H	12	10	22
Mn	Mg	-2759,589	-12,620	-305,576	1 H		1 H	1 H	1 H	1 H +1 sb	1 H + 2 sb	2 sb	4 sb	3 H + 2 π-π	3 H	2 H	1 H	15	9	24
Mn	Mn	-2751,969	-15,088	-194,809		1 H	1 H		1 H	2 sb	2 sb	1 sb	4 sb	3 H + 2 π-π	3 H	2 H	1 H	12	9	21

Mn	Ni	-2759,113	-13,466	-334,837		1 H	1 H		1 H	1 H +1 sb	3 sb	2 sb	4 sb	3 H + 2 π-π	3 H	2 H	1 H	13	10	23
Mn	Zn	-2759,452	-12,771	-298,184	1 H	1 H	1 H	1 H	1 H	1 H +1 sb	1 H + 2 sb	1 sb	4 sb	3 H + 2 π-π	3 H	2 H	1 H	16	8	24
Ni	Ca	-2744,497	-14,841	-183,120		1 H	1 H	1 H	1 H	1 H +1 sb	3 sb	1 sb	4 sb	3 H + 2 π-π	3 H	2 H	1 H	14	9	23
Ni	Cd	-2759,130	-13,827	-150,450	1 H					1 H	1 H + 3 sb	3 sb	4 sb	3 H + 2 π-π	2 H	1 H	1 H	10	10	20
Ni	Co	-2759,243	-15,352	-164,046	1 H	1 H	1 H		1 H	1 H +1 sb	3 sb	2 sb	4 sb	3 H + 2 π-π	3 H	2 H	1 H	14	10	24
Ni	Cu	-2759,212	-15,133	-176,972		1 H	1 H	1 H	1 H	1 H +1 sb	3 sb	2 sb	4 sb	3 H + 2 π-π	2 H	2 H		12	10	22
Ni	Mg	-2760,289	-11,068	-264,131		1 H		1 H		3 H	1 H + 3 sb	2 sb	3 sb	3 H + 2 π-π	2 H	1 H	1 H	13	8	21
Ni	Mn	-2759,257	-13,123	-162,354	1 H	1 H	1 H	1 H	1 H	1 H +1 sb	1 H + 3 sb	1 sb	4 sb	3 H + 2 π-π	3 H	2 H	1 H	16	9	25
Ni	Ni	-2759,252	-14,913	-176,985		1 H		1 H		2 sb	2 sb	1 sb	4 sb	3 H + 2 π-π	3 H	2 H	1 H	11	9	20
Ni	Zn	-2760,034	-11,135	-268,373		1 H		1 H		2 H + 1 sb	3 sb	2 sb	3 sb	3 H + 2 π-π	2 H	1 H	1 H	11	9	20
Zn	Ca	-2763,363	-12,208	-179,541		1 H	1 H		1 H	2 sb	2 sb	1 sb	4 sb	3 H + 2 π-π	3 H	2 H	1 H	12	9	21
Zn	Cd	-2761,390	-12,431	-174,903						2 sb	2 sb	1 sb	4 sb	3 H + 2 π-π	3 H	2 H	1 H	9	9	18
Zn	Со	-2761,524	-12,809	-199,065		1 H	1 H		1 H	2 sb	2 sb	1 sb	4 sb	3 H + 2 π-π	3 H	2 H	1 H	12	9	21
Zn	Cu	-2761,459	-12,261	-184,822		1 H	1 H		1 H	1 H +1 sb	3 sb	2 sb	4 sb	3 H + 2 π-π	3 H	2 H	1 H	13	10	23
Zn	Mg	-2762,151	-12,051	-293,844		1 H				2 H + 1 sb	3 sb	2 sb	3 sb	3 H + 2 π-π	2 H	1 H	1 H	10	9	19
Zn	Mn	-2761,538	-13,391	-181,460	1 H	1 H	1 H		1 H	2 sb	2 sb	1 sb	4 sb	3 H + 2 π-π	3 H	2 H	1 H	13	9	22
Zn	Ni	-2761,527	-11,276	-278,460		1 H		1 H		2 H + 1 sb	3 sb	1 sb	2 sb	3 H + 2 π-π	2 H	1 H	1 H	11	7	18
Zn	Zn	-2762,022	-12,576	-177,136	1 H					1 H + 1 sb	3 sb	1 sb	4 sb	3 H + 2 π-π	3 H	2 H	1 H	11	9	20

* H – водородные связи, sb – ионные связи, *π*-*π*-*π*-взаимодействия.

Таблица П5. Нуклеотидные последовательности, использованные при оценке влияния углеводов на ПЦР-амплификацию сложных мишеней.

Организм/ локус	Ампликон	Последовательность, 5' → 3'	Длина, п.о.	%GC
	MR-S	CCGTTGGATTGGGGTCTAAGGCCCGGGATGGAGCCCGTGGGGATCGCCGAGTAATCT CGGGTTCACGTTCCCCCGGACCCCGGTCGCCCGGCCCAGTTCGACGGTAGCAATCGA GGAGATGGCCCGCTCATGCGAGCGTCCGGCCCAGGGGCAAGCTCCACGGGTTTGCGC GTGGTGCCGCGGCTAACGCCGCGTCCCCGCCGCGCGGGGCTGCTGGTCCCCGGAGTC CTCGGACAGCTTTGGCCGTTCTCCCGTCTGCGGCGCTTTTGCTTCGGATGCCTTCCCGA CCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTCTAACATGTGCGCGAGTCACTGGGAAACAC	352	66,8
		TAAACC		
<i>M.religiosa/</i> ген 28 <i>S pPHK</i>	MR-M	CCGTTGGATTGGGGTCTAAGGCCCGGGATGGAGCCCGTGGGGATCGCCGAGTAATCT CGGGTTCACGTTCCCCCGGACCCCGGTCGCCCGGCCCAGTTCGACGGTAGCAATCGA GGAGATGGCCCGCTCATGCGAGCGTCCGGCCCAGGGGGCAAGCTCCACGGGTTTGCGC GTGGTGCCGCGGGCTAACGCCGCGTCCCCGCCGCCGCGGGCTGCTGGTCCCCGGAGTC CTCGGACAGCTTTGGCCGTTCTCCCGTCTGCGGCGCCTTTTGCTTCGGATGCCTTCCCGA CCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTCTAACATGTGCGCGAGTCACTGGGAAACAC TAAACCCAGAGGCGCAATGAAAGTGAGGCGGCCTCGTGCCGCCGAGGGAGG	525	66,9

	MR-L	CGTGTGAAACATAACGCAGGGAGATGTCGTGTGAGGGACGCTCCGCAACCCGACGTT	1029	63,0
		CGGCGGCGAGTTCAAGTCTCCCTTGAAAGGGGCCACAGCCCACAGAGGGTGCCAGGC		
		CCGTAGAGACCGTCGCCGTTCGCGGGGGGGGGGGGGGGG		
		GTGGAGCACTAAGTGGGTGGTAAACTCCATCTAAGGCTAAATATGACCACGAGACCG		
		ATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTGAAAAGAACTTTGAAGAGAGAG		
		AGTACGTGAAACCGTTCAGGGGGTAAACGGGAGGGATCCGGAAGGTCGAAAGGGGAG		
		ACTCAACCCGTCCGCTCGTCGGCACTCTGTCGCGAACTATTCCGGATGAGTACGGCG		
		GCCGGCTACACCGCAAGGTGCTAGACCGGTTACGTCGTAGGCACCGGCCGG		
		GTCTGGCGGCGGTGGGGTGCACTTCTCCTCCTGTAGGACGTCGCGACCCGTTGGATTG		
		GGGTCTAAGGCCCGGGATGGAGCCCGTGGGGATCGCCGAGTAATCTCGGGTTCACGT		
		TCCCCCGGACCCCGGTCGCCCGGCCCCAGTTCGACGGTAGCAATCGAGGAGATGGCC		
		CGCTCATGCGAGCGTCCGGCCCAGGGGGCAAGCTCCACGGGTTTGCGCGTGGTGCCGC		
		GGCTAACGCCGCGTCCCCGCCGCCGCGGGGCTGCTGGTCCCCGGAGTCCTCGGACAGC		
		TTTGGCCGTTCTCCCGTCTGCGGCGCTTTTGCTTCGGATGCCTTCCCGACCCGTCTTGA		
		AACACGGACCAAGGAGTCTAACATGTGCGCGAGTCACTGGGAAACACTAAACCCAGA		
		GGCGCAATGAAAGTGAGGCGGCCTCGTGCCGCCGAGGGAGG		
		GAGCCCGCACTCCCGGGGCGCCCCGGGCTTCGGCCGTGGGCGCACTCTGAGCGTACAC		
		GTTGGGACCCGAAAGATGGTGAACTATGCCTGGCCAGGACGAAGTCAGGGGAAAC		
	phL-S	GATCAGCAGCCTGACGGATGCGGTGTCCGGCGACAGCCTGACTGCCCAGGAGGCACT	342	64,2
		CGCGACGCTGGCATTATCCGGTGATGATGACGGACCACGACAGGCCCGCAGTTATCA		
фаг Лямбда		GGTCATGAACGGCATCGCCGTGCTGCCGGTGTCCGGCACGCTGGTCAGCCGGACGCG		
		GGCGCTGCAGCCGTACTCGGGGGATGACCGGTTACAACGGCATTATCGCCCGTCTGCAA		
		CAGGCTGCCAGCGATCCGATGGTGGACGGCATTCTGCTCGATATGGACACGCCCGGC		

	GGGATGGTGGCGGGGGGCATTTGACTGCGCTGACATCATCGCCCGTGTGCGTGACATA		
	AAACCG		
phL-M	ATGCTGCTGGGTGTTTATGCCTACTTTATAGAGCATAAGCAGCGCAACACCCTTATCT	1019	53,8
1	GGTTGCCGACGGATGGTGATGCCGAGAACTTTATGAAAACCCACGTTGAGCCGACTA		
	TTCGTGATATTCCGTCGCTGCTGGCGCTGGCCCCGTGGTATGGCAAAAAGCACCGGGA		
	TAACACGCTCACCATGAAGCGTTTCACTAATGGGCGTGGCTTCTGGTGCCTGGGCGGT		
	AAAGCGGCAAAAAACTACCGTGAAAAAGTCGGTGGATGTGGCGGGTTATGATGAACTT		
	GCTGCTTTTGATGATGATGATATTGAACAGGAAGGCTCTCCGACGTTCCTGGGTGACAAGC		
	GTATTGAAGGCTCGGTCTGGCCAAAGTCCATCCGTGGCTCCACGCCAAAAGTGAGAG		
	CCACCTCTCACATTGACCCTCCACCACTGAATCCCCCCCATTTTATCCCTTTCATCT		
	ATGCCTGCGTCATCCGCCAGCAGGAGCTGGACTTTACTGATGCCCGTTATATCTGCGA		
	AAAGACCGGGATCTGGACCCGTGATGGCATTCTCTGGTTTTCGTCATCCGGTGAAGAG		
	ATTGAGCCACCTGACAGTGTGACCTTTCACATCTGGACAGCGTACAGCCCGTTCACCA		
	CCTGGGTGCAGATTGTCAAAGACTGGATGAAAACGAAAGGGGATACGGGAAAACGT		
	AAAACCTTCGTAAACACCACGCTCGGTGAGACGTGGGAGGCGAAAATTGGCGAACGT		
	CCGGATGCTGAAGTGATGGCAGAGCGGAAAGAGCATTATTCAGCGCCCGTTCCTGAC		
	CGTGTGGCTTACCTGACCGCCGGTATCGACTCCCAGCTGGACCGCTACGAAATGCGCG		
	TATGGGGATGGGGGCCGGGTGAGGAAAGCTGGCTGATTGA		
phL-L	CTGGACACCTCCAGCCGTAAGCTGGTTGCGTGGGATGGCACCACCGACGGTGCTGCC	3063	56,4
	GTTGGCATTCTTGCGGTTGCTGCTGACCAGACCAGCACCACGCTGACGTTCTACAAGT		
1			

CCGGCACGTTCCGTTATGAGGATGTGCTCTGGCCGGAGGCTGCCAGCGACGAGACGA	
AAAAACGGACCGCGTTTGCCGGAACGGCAATCAGCATCGTTTAACTTTACCCTTCATC	
ACTAAAGGCCGCCTGTGCGGCTTTTTTACGGGATTTTTTATGTCGATGTACACAACC	
GCCCAACTGCTGGCGGCAAATGAGCAGAAATTTAAGTTTGATCCGCTGTTTCTGCGTC	
TCTTTTTCCGTGAGAGCTATCCCTTCACCACGGAGAAAGTCTATCTCTCACAAATTCCG	
GGACTGGTAAACATGGCGCTGTACGTTTCGCCGATTGTTTCCGGTGAGGTTATCCGTT	
CCCGTGGCGGCTCCACCTCTGAATTTACGCCGGGATATGTCAAGCCGAAGCATGAAGT	
GAATCCGCAGATGACCCTGCGTCGCCTGCCGGATGAAGATCCGCAGAATCTGGCGGA	
CCCGGCTTACCGCCGCCGTCGCATCATCATGCAGAACATGCGTGACGAAGAGCTGGC	
CATTGCTCAGGTCGAAGAGATGCAGGCAGTTTCTGCCGTGCTTAAGGGCAAATACACC	
ATGACCGGTGAAGCCTTCGATCCGGTTGAGGTGGATATGGGCCGCAGTGAGGAGAAT	
AACATCACGCAGTCCGGCGGCACGGAGTGGAGCAAGCGTGACAAGTCCACGTATGAC	
CCGACCGACGATATCGAAGCCTACGCGCTGAACGCCAGCGGTGTGGTGAATATCATC	
GTGTTCGATCCGAAAGGCTGGGCGCTGTTCCGTTCCTTCAAAGCCGTCAAGGAGAAGC	
TGGATACCCGTCGTGGCTCTAATTCCGAGCTGGAGACAGCGGTGAAAGACCTGGGCA	
AAGCGGTGTCCTATAAGGGGATGTATGGCGATGTGGCCATCGTCGTGTATTCCGGACA	
GTACGTGGAAAACGGCGTCAAAAAGAACTTCCTGCCGGACAACACGATGGTGCTGGG	
GAACACTCAGGCACGCGGTCTGCGCACCTATGGCTGCATTCAGGATGCGGACGCACA	
GCGCGAAGGCATTAACGCCTCTGCCCGTTACCCGAAAAACTGGGTGACCACCGGCGA	
TCCGGCGCGTGAGTTCACCATGATTCAGTCAGCACCGCTGATGCTGCTGGCTG	
GATGAGTTCGTGTCCGTACAACTGGCGTAATCATGGCCCTTCGGGGGCCATTGTTTCTCT	
GTGGAGGAGTCCATGACGAAAGATGAACTGATTGCCCGTCTCCGCTCGCT	
CAACTGAACCGTGATGTCAGCCTGACGGGGACGAAAGAAGAACTGGCGCTCCGTGTG	
GCAGAGCTGAAAGAGGAGCTTGATGACACGGATGAAACTGCCGGTCAGGACACCCCT	

CTCAGCCGGGAAAATGTGCTGACCGGACATGAAAATGAGGTGGGATCAGCGCAGCCG	
GATACCGTGATTCTGGATACGTCTGAACTGGTCACGGTCGTGGCACTGGTGAAGCTGC	
ATACTGATGCACTTCACGCCACGCGGGATGAACCTGTGGCATTTGTGCTGCCGGGAAC	
GGCGTTTCGTGTCTCTGCCGGTGTGGCAGCCGAAATGACAGAGCGCGGGCCTGGCCAG	
AATGCAATAACGGGAGGCGCTGTGGCTGATTTCGATAACCTGTTCGATGCTGCCATTG	
CCCGCGCCGATGAAACGATACGCGGGTACATGGGAACGTCAGCCACCATTACATCCG	
GTGAGCAGTCAGGTGCGGTGATACGTGGTGTTTTTGATGACCCTGAAAATATCAGCTA	
TGCCGGACAGGGCGTGCGCGTTGAAGGCTCCAGCCCGTCCCTGTTTGTCCGGACTGAT	
GAGGTGCGGCAGCTGCGGCGTGGAGACACGCTGACCATCGGTGAGGAAAATTTCTGG	
GTAGATCGGGTTTCGCCGGATGATGGCGGAAGTTGTCATCTCTGGCTTGGACGGGGCG	
TACCGCCTGCCGTTAACCGTCGCCGCTGAAAGGGGGGATGTATGGCCATAAAAGGTCTT	
GAGCAGGCCGTTGAAAACCTCAGCCGTATCAGCAAAACGGCGGTGCCTGGTGCCGCC	
GCAATGGCCATTAACCGCGTTGCTTCATCCGCGATATCGCAGTCGGCGTCACAGGTTG	
CCCGTGAGACAAAGGTACGCCGGAAACTGGTAAAGGAAAGGGCCAGGCTGAAAAGG	
GCCACGGTCAAAAATCCGCAGGCCAGAATCAAAGTTAACCGGGGGGGATTTGCCCGTA	
ATCAAGCTGGGTAATGCGCGGGTTGTCCTTTCGCGCCGCAGGCGTCGTAAAAAGGGG	
CAGCGTTCATCCCTGAAAGGTGGCGGCAGCGTGCTTGTGGTGGGTAACCGTCGTATTC	
CCGGCGCGTTTATTCAGCAACTGAAAAATGGCCGGTGGCATGTCATGCAGCGTGTGGC	
TGGGAAAAACCGTTACCCCATTGATGTGGTGAAAATCCCGATGGCGGTGCCGCTGAC	
CACGGCGTTTAAACAAAATATTGAGCGGATACGGCGTGAACGTCTTCCGAAAGAGCT	
GGGCTATGCGCTGCAGCATCAACTGAGGATGGTAATAAAGCGATGAAACATACTGAA	
CTCCGTGCAGCCGTACTGGATGCACTGGAGAAGCATGACACCGGGGGCGACGTTTTTTG	
ATGGTCGCCCGCTGTTTTTGATGAGGCGGATTTTCCGGCAGTTGCCGTTTATCTCACC	
GGCGCTGAATACACGGGCGAAGAGCTGGACAGCGATACCTGGCAGGCGGAGCTGCAT	

		ATCGAAGTTTTCCTGCCTGCTCAGGTGCCGGATTCAGAGCTGGATGCGTGGATGGA		
	H-S	TCATTGAGCTGCGGGAGCTGGCACCCGCTGGGCGCGCGCG	199	73,9
Homo sapience/ промотор гена RASSF1A	H-L	CTCTAGCACAGTAAAGCTGGCCTCCAGAAACACGGGTATCTCCGCGTGGTGCTTTGCG GTCGCCGTCGTTGTGGCCGTCCGGGGGTGGGGGTGTGAGGAGGGGACGAAGGAGGGAAG GAAGGGCAAGGCGGGGGGGG	793	70,1

	Концен-	Добавка									
Ампликон	трация добавки, %	ДМСО	трегалоза	сахароза	лактоза	глюкоза	манноза	галактоза	фруктоза	инулин	фикол 400
MR-S	2	5,89±0,23	1,24±0,31	3,92±0,19	-1,08±0,37	-0,31±0,57	$4,14\pm0,18$	-2,05±0,12	-0,62±0,45	-0,73±0,37	-1,33±0,24
	4	5,27±0,11	2,92±0,17	5,53±0,28	-0,75±0,29	4,45±0,26	6,45±0,33	-2,18±0,25	4,15±0,10	-0,19±0,25	-0,86±0,17
	6	4,43±0,19	4,56±0,09	6,26±0,04	$1,74\pm0,08$	6,12±0,44	6,81±0,27	2,37±0,19	7,04±0,28	0,48±0,22	-0,04±0,35
	8	3,36±0,25	5,95±0,24	6,67±0,16	2,58±0,19	5,77±0,24	6,22±0,15	3,09±0,26	6,97±0,30	1,04±0,13	2,21±0,32
	10	1,01±0,09	5,47±0,38	6,12±0,09	1,73±0,09	5,07±0,13	5,36±0,17	3,14±0,08	5,58±0,15	2,15±0,20	2,76±0,18
MR-M	2	5,23±0,15	-0,07±0,56	4,67±0,14	-2,11±0,13	-1,06±0,28	3,91±0,20	-1,91±0,09	-0,02±0,27	-1,15±0,29	-0,69±0,18
	4	5,16±0,04	3,79±0,23	5,80±0,09	-2,39±0,21	5,82±0,18	7,31±0,51	-2,68±0,03	6,58±0,06	-1,56±0,40	0,39±0,09
	6	4,01±0,32	6,53±0,05	6,09±0,24	2,54±0,36	5,64±0,23	5,74±0,23	3,55±0,16	6,59±0,15	0,21±0,12	0,91±0,21
	8	3,10±0,49	6,18±0,11	6,45±0,08	2,44±0,16	5,08±0,49	$5,80\pm0,05$	3,24±0,09	6,27±0,10	0,63±0,31	1,62±0,15
	10	1,33±0,03	5,98±0,11	5,88±0,39	1,05±0,23	4,58±0,22	4,58±0,03	3,27±0,06	6,15±0,03	1,77±0,23	2,25±0,16
MR-L	2	4,86±0,22	0,23±0,44	1,89±0,26	-1,49±0,10	0,22±0,20	2,54±0,07	0,59±0,16	1,44±0,35	-0,76±0,47	0,20±0,16
	4	$5,05\pm0,12$	1,17±0,06	$2,45\pm0,20$	$-2,07\pm0,56$	2,63±0,23	5,38±0,21	1,36±0,08	4,56±0,16	-0,45±0,09	0,13±0,33
	6	5,40±0,17	2,35±0,15	2,94±0,31	$-1,15\pm0,18$	3,47±0,45	5,16±0,25	2,30±0,16	5,26±0,19	-0,05±0,14	0,44±0,11
	8	4,39±0,35	3,32±0,21	3,67±0,17	$0,76\pm0,14$	3,32±0,13	4,98±0,29	3,34±0,20	5,89±0,31	0,51±0,18	0,57±0,24
	10	4,11±0,08	2,87±0,19	3,23±0,14	1,25±0,19	4,30±0,64	5,76±0,57	3,65±0,12	5,45±0,33	0,88±0,21	1,80±0,42
phL-S	2	4,84±0,26	1,15±0,31	5,20±0,18	$-2,33\pm0,12$	-1,11±0,30	2,25±0,16	-2,38±0,18	1,10±0,44	-2,33±0,21	1,27±0,35
	4	5,38±0,15	4,07±0,05	6,14±0,13	-2,16±0,08	2,66±0,28	4,48±0,34	-2,77±0,09	4,36±0,21	-2,69±0,32	1,02±0,43
	6	5,66±0,34	5,32±0,28	6,23±0,09	$1,29\pm0,10$	5,12±0,32	6,09±0,31	-0,32±0,26	6,89±0,75	-0,12±0,45	0,89±0,65

Таблица Пб. Значения ΔCt , полученные при оценке влияния углеводов на ПЦР-амплификацию сложных мишеней.

	8	2,36±0,23	6,81±0,61	6,10±0,22	$1,22\pm0,54$	6,34±0,13	5,69±0,23	4,08±0,46	7,13±0,17	2,73±0,54	2,16±0,20
	10	2,15±0,44	6,18±0,22	6,47±0,34	2,36±0,15	3,94±0,55	5,45±0,27	2,65±0,91	6,93±0,34	2,13±0,28	1,67±0,09
phL-L	2	3,97±0,16	1,68±0,29	2,61±0,17	-1,07±0,27	-0,33±0,41	4,17±0,32	$-0,50\pm0,22$	2,77±0,43	-0,60±0,16	0,34±0,27
	4	5,38±0,22	1,23±0,08	3,27±0,44	-1,65±0,22	2,83±0,37	6,23±0,45	1,76±0,18	4,14±0,26	-1,55±0,51	0,52±0,09
	6	5,13±0,37	2,70±0,37	2,87±0,16	-1,24±0,52	4,18±0,19	5,84±0,35	2,35±0,23	3,86±0,48	-2,19±0,56	0,44±0,10
	8	4,06±0,14	2,21±0,44	4,13±0,33	2,60±0,41	5,33±0,64	5,19±0,08	2,87±0,12	5,10±0,34	1,68±0,58	1,17±0,15
	10	4,21±0,43	3,36±0,18	3,79±0,25	2,21±0,15	5,19±0,26	5,38±0,20	4,06±0,65	4,75±0,27	0,92±0,33	2,56±0,23
phL-XL*	2	2,30±0,25	0,21±0,15	1,12±0,19	-1,34±0,27	-0,17±0,21	$1,19\pm0,10$	-2,58±0,25	$0,44\pm0,78$	-1,23±0,17	-0,87±0,23
	4	3,85±0,34	0,45±0,33	0,73±0,36	-0,14±0,31	0,32±0,18	1,06±0,48	-2,08±0,33	2,36±0,26	-1,46±0,37	-0,25±0,10
	6	3,78±0,23	1,36±0,09	$1,28\pm0,40$	1,00±0,24	1,28±0,23	1,20±0,22	-0,56±0,29	1,92±0,55	-0,16±0,14	0,11±0,34
	8	4,16±0,37	1,25±0,28	$1,17\pm0,47$	1,32±0,15	1,43±0,27	2,44±0,17	1,09±0,16	1,56±0,31	0,54±0,25	1,32±0,25
	10	4,65±0,19	1,39±0,65	0,91±0,25	2,10±0,45	0,88±0,25	2,34±0,36	1,23±0,62	1,18±0,08	0,73±0,63	1,76±0,06
	2	6,28±0,07	2,65±0,23	1,13±0,27	-0,36±0,12	-0,22±0,54	3,87±0,28	-1,77±0,24	1,43±0,09	-1,60±0,07	-1,07±0,04
H-S	4	5,54±0,26	3,57±0,18	3,57±0,38	0,56±0,33	-0,40±0,06	7,03±0,22	-0,63±0,37	3,55±0,18	-0,99±0,25	-1,16±0,28
	6	5,69±0,13	4,38±0,08	6,02±0,05	2,05±0,22	5,10±0,17	6,75±0,48	1,98±0,71	6,50±0,43	-0,06±0,37	0,09±0,15
	8	3,88±0,30	4,80±0,25	7,31±0,36	2,80±0,29	5,53±0,13	7,20±0,19	3,42±0,11	5,61±0,37	2,17±0,33	3,04±0,65
	10	1,75±0,45	6,16±0,35	6,74±0,28	2,32±0,17	4,85±0,20	4,26±0,31	3,34±0,25	5,95±0,15	1,56±0,17	2,69±0,51
	2	2,18±0,15	1,65±0,32	2,90±0,57	-0,93±0,27	-1,12±0,43	1,74±0,17	-0,49±0,14	2,44±0,25	-1,36±0,27	-0,33±0,46
H-L	4	4,72±0,23	1,53±0,18	2,68±0,10	-1,23±0,18	0,52±0,14	2,89±0,11	0,28±0,16	3,61±0,22	0,29±0,16	0,08±0,17
	6	5,61±0,07	4,86±0,33	3,91±0,61	-1,09±0,22	2,87±0,31	5,63±0,32	2,74±0,25	5,68±0,10	1,02±0,24	0,52±0,21
	8	5,28±0,19	5,15±0,26	4,53±0,27	0,56±0,09	4,29±0,25	5,22±0,18	3,07±0,38	5,35±0,17	0,73±0,31	0,87±0,14
	10	4,04±0,21	5,74±0,11	4,12±0,22	0,39±0,36	5,01±0,30	4,50±0,23	2,29±0,22	5,50±0,31	0,92±0,15	1,11±0,25

* phL-XL был амплифицирован с помощью ДНК-полимеразы Phusion U.