Биомика, 2021, Том 13, № 4. С.444-456

BIOMICS/БИОМИКА

ISSN 2221-6197 http://biomicsj.ru

РАЗНООБРАЗИЕ МЕТОДОВ ДЕТЕКЦИИ ПОЛИМОРФНЫХ НУКЛЕОТИДОВ В ИЗВЕСТНЫХ СНИПАХ. II. АЛЛЕЛЬ-СПЕЦИФИЧНАЯ ГИБРИДИЗАЦИЯ, ПЦР-ПДРФ, ХИМИЧЕСКИЙ И ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ МЕТОДЫ ДЕТЕКЦИИ МУТАЦИЙ В ГЕТЕРОДУПЛЕКСАХ

[1]Сахабутдинова А.Р., [1]Гарафутдинов Р.Р., [2]Чемерис Д.А., [1]Кулуев А.Р., [1]Кулуев Б.Р., [1]Чемерис А.В.

[1]Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Россия, 450054, Уфа, пр. Октября, 71, garafutdinovr@mail.ru
[2]ООО «Максим Медикал», Россия, 123423, Москва, ул. Народного Ополчения, д. 34, стр. 1

Резюме

Замены одиночных нуклеотидов (SNP) составляют значительную долю полиморфизма ДНК практически любых организмов и оказывают заметное влияние на их жизненный статус. Детекция уже известных SNP крайне важна, что обусловливает огромное разнообразие предложенных на сегодняшний день методов SNP-типирования. Одними из наиболее ранних методов анализа SNP являются аллель-специфичная гибридизация с олигонуклеотидами, получившая развитие в виде флуоресцентно-меченных зондов, и ПЦР-ПДРФ, основанный на расщеплении ампликонов подходящими рестрикционными эндонуклеазами, на сайты которых приходятся полиморфные нуклеотиды, или конструировании праймеров таким образом, что подобные сайты генерируются непосредственно в ходе ПЦР. Кратко рассмотрены также методы детекции одиночных нуклеотидов в гетеродуплексах с помощью некоторых химических реагентов и ряда эндонуклеаз.

Ключевые слова: ДНК, однонуклеотидный полиморфизм, ОНП, снип, ПЦР, аллель-специфичная гибридизация, ПЦР-ПДРФ, гетеродуплекс, эндонуклеазы, детекция мутаций химическим расщеплением, детекция мутаций расщеплением эндонуклеазами

Цитирование: Сахабутдинова А.Р., Гарафутдинов Р.Р., Чемерис Д.А., Кулуев А.Р., Кулуев Б.Р., Чемерис А.В. Разнообразие методов детекции полиморфных нуклеотидов в известных снипах. II. Аллель–специфичная гибридизация, ПЦР-ПДРФ, химический и ферментативный методы детекции мутаций в гетеродуплексах // Биомика. 2021. Т.13(4). С.444-456. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2021-31

© Авторы

THE DIVERSITY OF METHODS FOR THE DETECTION OF POLYMORPHIC NUCLEOTIDES IN THE KNOWN SNPs. II. ALLELE-SPECIFIC HYBRIDIZATION, PCR-RFLP, CHEMICAL AND ENZYMATIC METHODS FOR DETECTING MUTATIONS IN HETERODUPLEXES

[1]Sakhabutdinova A.R., [1]Garafutdinov R.R., [2]Chemeris D.A., [1]Kuluev A.R., [1]Kuluev B.R., [1]Chemeris A.V.

[1]Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, Russia, Ufa, 450054, 71 Pr. Oktyabrya, E-mail: garafutdinovr@gmail.com
[2]Maxim Medical LLC, 34-1 Narodnogo Opolcheniya str., Moscow, 123423, Russia

Resume

Due to the fact that single nucleotide substitutions account for the largest share of DNA polymorphism in almost any organisms and have a noticeable effect on their vital status, the detection of already known such polymorphic nucleotides is extremely important. This explains the huge variety of methods of such genotyping. Among the old approaches to the detection of polymorphic nucleotides, allele-specific

hybridization with oligonucleotides stands out, which later received a new life in the form of fluorescently labeled probes. Also, such a method as PCR-RFLP, based on the cleavage of amplicons by suitable restriction endonucleases, whose sites contain polymorphic nucleotides or primers are designed in such a way that such sites arise during PCR, is not completely forgotten. The methods used relatively less frequently for detecting mutations in heteroduplexes using some chemical reagents, as well as using some endonucleases, are also briefly considered in this review.

Keywords: DNA, single-nucleotide polymorphism, SNP, PCR, PCR-RFLP, allele-specific hybridization, heteroduplex, endonuclease, Chemical Cleavage of Mismatch, Enzymatic Mismatch Cleavage

Citation: Sakhabutdinova A.R., Garafutdinov R.R., Chemeris D.A., Kuluev A.R., Kuluev B.R., Chemeris A.V. The diversity of methods for the detection of polymorphic nucleotides in the known SNPs. II. Allele-specific hybridization, PCR-RFLP, chemical and enzymatic methods for detecting mutations in heteroduplexes. *Biomics*. 2021. V.13(4). P.444-456. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2021-31 (In Russian)

© Authors

Введение

Во вводной статье [Гарафутдинов и др. (Garafutdinov et al.), 2021] к циклу публикаций, посвященных генотипированию однонуклеотидного полиморфизма (ОНП), или иначе детекции известных снипов (SNP – Single-Nucleotide Polymorphism), мы коротко изложили причины огромного интереса к этому типу полиморфизма геномов близкородственных организмов, пояснив, что под ним понимается, и дав небольшую историческую справку о развитии таких исследований. Было также отмечено, что в последующих обзорах материал будет подаваться с соблюдением по возможности хронологического порядка, поэтому в этой статье описываются довольно старые методы детекции ОНП, часть которых до сих пор не утратила полностью своей значимости, или они трансформировались в более современные способы и протоколы.

Аллель–специфичная олигонуклеотидная гибридизация

После того как в первой половине 1980-х гг. был налажен автоматический синтез олигонуклеотидов, спектр их применения заметно расширился и стал включать молекулярную гибридизацию для выявления последовательностей нуклеиновых кислот с использованием радиоактивных меток, что было необходимо для повышения чувствительности. Так, с помощью двух 19-звенных олигонуклеотидов, отличающихся одним азотистым основанием, были идентифицированы гены глобина человека – нормальный и приводящий к серповидно-клеточной анемии [Conner et al., 1983]. Позже эти же авторы назвали подобные гибридизационные пробы как ASO (Allele-Specific Oligonucleotide [Studencki et al., 1985]. Разработка метода ПЦР дала дополнительные возможности проведения такой гибридизации, позволив обходиться без радиоактивности.

Во второй половине 80-х гг. XX века возникла ДНК-криминалистика[1], и один из тогдашних подходов к ДНК-идентификации личности заключался в амплификации отдельных HLA-DQA1 локусов с помощью ПЦР и последующей дот-блот-гибридизации с радиоактивно мечеными олигонуклеотидными зондами, отличающимися как раз единичными заменами нуклеотидов [Saiki et al., 1986]. Позже для этой цели вместо радиоактивности стали применять модифицированные олигонуклеотиды, которые можно было пометить пероксидазой хрена и использовать цветной субстрат [Bugawan et al., 1988]. Разработка обратной дот-блот-гибридизации с иммобилизованными олигонуклеотидными зондами, несущими замены нуклеотидов для детекции нескольких типов HLA-DQA1 локусов, и ПЦР с праймерами, меченными по 5’-концам биотином, позволила дополнительно улучшить данный метод. Но еще до этого была опубликована статья, демонстрирующая возможность амплификации HLA-DQA1 локуса и детекции ампликонов путем гибридизации с ASO и проявлением результатов гибридизации с помощью цветной реакции пероксидазы хрена с тетраметилбензидином, используя ДНК, выделенную из единичной волосяной луковицы [Higuchi et al., 1988]. На основе этого подхода использования HLA-DQA1 локусов для целей ДНК-идентификации личности американской фирмой Perkin-Elmer даже стал выпускаться коммерческий набор, в котором для выявления ОНП использовался подход так называемой «обратной дот-блот-гибридизации», когда на полосках нейлоновой мембраны сорбировались различные аллель-специфичные олигонуклеотиды.

[1] Становление и развитие ДНК-криминалистики нами очень подробно рассмотрено в одноименной коллективной монографии [Чемерис и др. (Chemeris et al.), 2022].

Гибридизация последних с соответствующими биотинилированными ампликонами и их связывание с комплексом стрептавидин-щелочная фосфатаза, сопровождаемые добавлением субстрата, приводили к получению цветных сигналов. Мечение пробы дигоксигенином позволило детектировать ОНП иммунохроматографически с помощью метода CASSOH (Competitive Allele-Specific Short Oligonucleotide Hybridization) [Matsubara, Kure, 2003].

Применение ASO для анализа ОНП продолжилось и дальше, в том числе претерпев преобразования, в первую очередь за счет их мечения флуорохромами, о чем пойдет речь в дальнейших публикациях из этого же цикла.

Выявление однонуклеотидных замен с помощью рестрикционных эндонуклеаз

Очень важным инструментом в молекулярной биологии являются рестрикционные эндонуклеазы, узнающие и расщепляющие ДНК по определенным последовательностям нуклеотидов. Но если на сайт узнавания такого фермента будет приходиться однонуклеотидная замена, то расщепления не произойдет, что может служить свидетельством присутствия в снипе того или иного нуклеотида. Серьезным ограничением этого подхода является необходимость расположения полиморфного нуклеотида в сайте рестрикции, что имеет место далеко не всегда. Тем не менее, данный подход анализа снипов был разработан [Deng, 1988], и поскольку для исключения работы с радиоактивностью[2] требовалась наработка целевого ампликона с помощью ПЦР, то он получил название PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) или ПЦР-ПДРФ (Полиморфизм Длины Рестрикционных Фрагментов). По сути такой же метод выявления однонуклеотидных замен другими авторами несколько позже был назван как PCR-ASRA (allele-specific restriction enzyme analysis [Simsek et al., 1994].

Ряд компьютерных программ SPR Opt (SNP and PCR-RFLP Optimization) [Gardner, Wagner, 2005], SNP-RFLPing и SNP-RFLPing 2 [Chang et al., 2006; 2010] были созданы для поиска в геномах разных организмов снипов, которые могли бы детектироваться с помощью метода ПЦР-ПДРФ. Однако необходимо анализировать ни какие попало снипы, а только те, что представляют определенный интерес в связи со стоящими перед экспериментаторами задачами, и поэтому такой поиск не решает главной проблемы отсутствия полиморфных нуклеотидов в потенциальных сайтах рестрикционных эндонуклеаз. Но имеются другие возможности, к которым сейчас перейдем.

В целом ряде современных работ сообщается о намеренном создании сайтов рестрикционных эндонуклеаз, несущих полиморфные нуклеотиды за счет подбора праймеров таким образом, что в них включается один неспариваемый нуклеотид, в целом ненарущающий специфичность амплификации, но обеспечивающий вкупе с полиморфным нуклеотидом в снипе возникновение или невозникновение сайта рестрикции [Sharma, Changota, 2017; Wang et al., 2016; 2017]. Данные подходы даже получили свои названия – A-RFLP (Artificial Restriction Fragment Length Polymorphism) и CRS-PCR (Created Restriction Site). Относительно недавно предложен аналогичный способ детекции снипов, названный авторами как dPACS (derived Polymorphic Amplified Cleaved Sequence), особенностью которого служат более длинные праймеры (35 – 55 звеньев) с неспариваемыми в нужном месте нуклеотидами, формирующими сайты узнавания рестрикционных эндонуклеаз [Kaundum et al., 2019]. Справедливости ради следует сказать, что подобная модификация праймеров для детекции точечных мутаций была описана ранее и названа как PCR-PIRA (primer-introduced restriction analysis) [Jacobson, Moskovits, 1991] и даже еще раньше в конце 1988 г. и в самом начале 1989 г. такой подход уже использовался [Kumar, Barbacid, 1988; Kumar, Dunn, 1989]. Чуть позже другие авторы назвали его как ACRS (Amplification Created Restriction Site) [Lien et al., 1992] и RG-PCR (Restriction site Generating) [Gasparini et al., 1992]. Учитывая, что при искусственном создании сайта рестрикции, затрагивающего анализируемую однонуклеотидную замену, необходимо выбирать наиболее оптимальный фермент в одной из работ была предложена формула, позволяющая рассчитать вероятность такого подбора для вводимого числа рестрикционных эндонуклеаз [Eiken et al., 1991]. Много лет спустя воспроизводимость метода ACRS была улучшена за счет добавления дополнительных сайтов используемой рестрикционной эндонуклеазы в обратный праймер для контроля действия фермента [Hosseini et al., 2006].

Пожалуй, стоит также обратить внимание на работы одной группы авторов [Haliassos et al., 1989; 1989a], предложивших нечто среднее между ПЦР-ПДРФ и аллель-специфичной ПЦР (АС-ПЦР). Так, ими были сконструированы один общий (обратный) и два прямых праймера и на 3’-конце последних располагался дискриминирующий нуклеотид, приводящий в одном случае к возникновению сайта рестрикционной эндонуклеазы *Msp*I. Однако АС-ПЦР будет посвящена другая наша статья и здесь на этом вопросе останавливаться не будем.

[2] применяемой для повышения чувствительности

Таблица 1

Детекция снипов (мутаций) с помощью различных вариантов ПЦР-ПДРФ
Table 1 - Detection of SNP (mutations) using various variants of PCR-RFLP

Метод Method	Ссылка Reference
PCR-RFLP	Deng, 1988
ACRS	Kumar, Barbacid, 1988; Haliassos et al., 1989; Lien et al., 1992
PCR-PIRA	Jacobson, Moskovits, 1991
RG-PCR	Gasparini et al., 1992
PCR-ASRA	Simsek et al., 1994
A-RFLP	Sharma, Changota, 2017
CRS-PCR	Wang et al., 2016; 2017
dPACS	Kaundum et al., 2019

Несмотря на приведенные в таблице 1 восемь различных названий предложенных вариантов ПЦР-ПДРФ, все же правильнее будет считать, что таковых всего только два - PCR-RFLP и ACRS. При этом dPACS также можно считать разновидностью ACRS.

Некоторое время назад были разработаны специальные программы для дизайна праймеров, которые бы включали последовательности, приводящие к возникновению сайтов узнавания подходящих рестрикционных эндонуклеаз, приходящихся на полиморфные нуклеотиды в снипах [Ke et al., 2001; Neff et al., 2002].

Детекция продуктов ПЦР-ПДРФ осуществляется в первую очередь с помощью обычного электрофореза в агарозных или полиакриламидных гелях (в зависимости от размеров ампликонов), но в литературе можно встретить применение и капиллярного гель-электрофореза [Bazakos et al., 2012] и микрофлуидных чипов [Wang et al., 2009], а также гель-хроматографии в денатурирующих условиях [Abbas et al., 2004]. Описано быстрое разделение продуктов ПЦР-ПДРФ с помощью времяпролетной масс-спектрометрии [Taranenko et al., 1996]. К сожалению, использование любых вариантов ПЦР-ПДРФ ограничено по производительности и для анализа большого числа снипов одновременно во многих образцах следует применять другие методы детекции.

Химическая детекция снипов в гетеродуплексах

Детекция мутаций (однонуклеотидных замен) с помощью некоторых химических реагентов с последующим разделением продуктов реакций по размеру гель-электрофорезом была предложена довольно давно [Cotton et al., 1988] и развивалась преимущественно усилиями лишь этой группы австралийских авторов [Cotton, Campbell, 1989; Ramus, Cotton, 1996; Ellis et al., 1998; Lambrinakos et al., 1999; Bui et al., 2002; 2003], хотя и другие исследователи, включая отечественных ученых, выполняли схожие работы [Несчастнова и др. (Neschastnova et al.), 2007; Логвина и др. (Logvina et al.), 2011; Gogos et al., 1990; Tindall, Whitaker, 1991; Rowley et al., 1995; Roberts et al., 1997; Yakubovskaya et al., 2010].

Этот метод получил название CCM – Chemical Cleavage of Mismatch. Лежащий в его основе принцип заключается в получении гетеродуплексных структур путем рестриктазного расщепления рекомбинантных плазмидных ДНК (в начальных экспериментах) или с помощью ПЦР, в которых при гибридизации цепей из разных ампликонов формируются неспаренные азотистые основания, приходящиеся на места мутаций. Поскольку пиримидины для таких экспериментов более реакционно-способны, то производится обнаружение возникающих в гетеродуплексах неспариваний типа C·A, C·C, C·T, G·T и T·T, в результате чего оказывающимися фактически одноцепочечными (частично выпетленными) тимины и цитозины становятся доступны для проведения необходимых химических реакций. При этом неспаривание пуринов G·A может быть опосредованно обнаружено, используя комплементарные цепи ДНК, где на этих местах будут соответствующие им пиримидины.

Обработка тиминов тетраоксидом осмия и цитозинов гидроксиламином приводит к раскрытию пиримидиновых колец, после чего цепи ДНК подвергаются β-элиминации пиперидином, что вызывает разрыв фосфодиэфирных связей по нахождению модифицированных оснований и в итоге происходит фрагментация молекул ДНК по местам мутаций. В одной из работ [Tindall, Whitaker, 1991] такая обработка получила название HOT (Hydroxylamine, Osmium Tetroxide). Получающиеся фрагменты ДНК разделяются гель-электрофорезом с целью определить их размеры и сделать вывод о наличии мутаций. Для детекции конечных продуктов реакции путем радиоавтографии обычно применяли для мечения гетеродуплексов радиоактивный фосфор-32 или серу-35 [Saleeba, Cotton, 1991], но было также показано, что можно с высокой чувствительностью окрашивать ДНК в гелях серебром [Saleeba et al., 1992]. Использование флуоресцентных меток в формируемых после завершения ПЦР гетеродуплексах, в которых производилось модификация пиримидинов гидроксиламином и тетраокисью осмия с последующим расщеплением цепей пиперидином вкупе с разделением

получающихся продуктов с помощью ДНК секвенатора, позволило назвать такой вариант FAMA (Fluorescence-Assisted Mismatch Analysis) [Verpy et al., 1994]. Спустя несколько лет другие авторы предложили схожий способ детекции мутаций FluoCCM [Freson et al., 1998].

В одной из обзорных публикаций [Smooker, Cotton, 1993] дана краткая историческая справка и описано развитие метода CCM. Первые годы для модификаций цитозинов и тиминов использовали гидроксиламин и тетраоксид осмия, позже последний реактив был заменен на перманганат калия. Причем эта замена была предложена другой группой экспериментаторов [Gogos et al., 1990], показавших, что перманганат калия специфично реагирует с тимином в присутствии тетраметиламмония хлорида. Однако из-за высокой токсичности последнего он позднее был заменен на тетраэтиламмоний хлорид [Roberts et al., 1997] и уже затем этот подход переняла все та же группа австралийских авторов во главе с R.G.H.Cotton [Lambrinakos et al., 1999]. Позже ими же было сообщено [Tabone et al., 2006] о разработке простого колориметрического подхода к детекции неспариваний тиминов и цитозинов, что авторы посчитали возможным экстраполировать на выявление полиморфных нуклеотидов в снипах. В его основе лежит окисление перманганатом калия неспаренных остатков тимина и цитозина в гетеродуплексах, сопровождаемое образованием двуокиси марганца и в зависимости от типа мутантного азотистого основания изменением окраски раствора от розовой через желтую до бесцветной с выпадением коричневого осадка, что позволило вести реакцию в микротитраторных планшетах с детекцией цвета раствора подходящим сканером без использования такого опасного реагента как пиперидин и соответственно без фрагментации молекул ДНК из-за чего этот подход уже к CCM формально не относится.

В одной из работ [Deeble et al., 1997/1998] для детекции мутаций (ОНП) было проведено сравнение методов CCM и EMC (Enzymatic Mismatch Cleavage), показавшее, что оба подхода способны работать с крупными фрагментами ДНК, но ферментативный метод, к рассмотрению которого ниже перейдем, позволяет обходиться без вредных химикатов. Объединяющим эти методы моментом служит детекция неспаренных нуклеотидов в специально формируемых гетеродуплексах.

Энзиматическая детекция снипов в гетеродуплексах

Помимо химической модификации выпетленных азотистых оснований (пиримидинов) для детекции мутаций было предложено использовать некоторые ферменты – различные эндонуклеазы, которые в норме предназначены репарировать *in vivo* подобные и некоторые другие нарушения двойной спирали ДНК. Как уже говорилось выше метод получил название Enzymatic Mismatch Cleavage (EMC), но нужно иметь ввиду, что подобная аббревиатура в той же базе PubMed присуща и терминологии ряда других направлений исследований.

Итак, EMC метод детекции мутаций, в отличие от CCM, позволяет выявлять все восемь типов неспариваний - A·A, C·C, G·G, T·T, C·A, C·T, G·A, G·T в формируемых гетеродуплексах. Впервые это было сообщено все теми же австралийскими исследователями во главе с R.G.H.Cotton в январе 1995 г.[3] [Youil et al., 1995]. В данной работе для детекции этих мутаций в гетеродуплексных продуктах ПЦР длиной от 133 до 1502 п.н. был использован фермент резолваза из бактериофага T4 в виде эндонуклеазы VII, известной также под аббревиатурой T4E7. В феврале того же 1995 г.[4] группа американских авторов [Mashal et al., 1995] описала детекцию мутаций (преимущественно в виде однонуклеотидных замен нескольких типов) в гетеродуплексных фрагментах ДНК длиной от 88 до 940 п.н. В этой работе, наряду с T4E7 использовалась и другая резолваза – эндонукеаза I из фага T7 – T7E1. За этими публикациями последовал целый ряд методологических статей, посвященных улучшению метода EMC, выполняемого с помощью эндонуклеаз T4E7 и T7E1, включая использование радиоактивности, окрашивание серебром, применение флуоресцентных меток, автоматизацию процесса и пр. [Babon et al., 1995; 1999; 2003; Del Tito, Jr. et al., 1998; Mean et al., 2004; Zhang et al., 2018].

В 1998 г. в сельдерее была найдена эндонуклеаза, получившая название SEL I, показавшая, что с ее помощью можно детектировать мутации в гетеродуплексах [Oleykowski et al., 1998]. Позднее этими же авторами была разработана технология подобной детекции ОНП [Kulinski et al., 2000]. На основе CEL I эндонуклеазы фирмой Transgenomic был подготовлен коммерческий набор Surveyor Nuclease [Qiu et al., 2004; 2005]. Разными группами авторов сравнивалась эффективность детекции мутаций с помощью Surveyor Nuclease и T7E1 эндонуклеазы и было показано, что оба фермента в целом обеспечивают высокую чувствительность и специфичность действия [Huang et al., 2011; Vouillot et al., 2015]. В одной из работ метод Surveyor был успешно использован вместе с HRM

[3] рукопись была получена редакцией 27 июня 1994 г.
[4] рукопись этой статьи поступила в редакцию 7 октября 1994 г.

плавлением ампликонов после проведения химического мутагенеза мягкой пшеницы с целью обнаружить возникшие мутации в гене крахмалсинтазы II [Dong et al., 2009].

Для детекции мутаций в гетеродуплексах было также предложено использовать еще и эндонуклеазу V из термофильной бактерии *Thermotoga maritima* вкупе с термостабильной Tsp лигазой, исправляющей нежелательные «ники» [Huang et al., 2002], после чего также вышла серия статей, описывающих улучшения этого метода [Pincas et al., 2004; Gao et al., 2006].

Заключение

Весьма активно применявшийся для выявления полиморфных нуклеотидов в снипах на протяжении многих лет метод ПЦР-ПДРФ обладает не очень высокой производительностью. Сейчас этот метод служит, прежде всего, для обучения студентов молекулярно-биологических специальностей определенным навыкам работы при исследовании полиморфизма ДНК [Zhang et al., 2013; 2017], но при этом продолжает использоваться в научных исследованиях, в том числе благодаря некоторым усовершенствованиям. Относительно недавно после геномного CRSPR/Cas редактирования мягкой пшеницы для выявления произведенных мутаций в пяти мишенях, расположенных в трех генах, был использован метод ПЦР-ПДРФ с соответствующими сайтам редактирования рестрикционными эндонуклеазами [Kamiya et al., 2020]. В частности при редактирования гена *TaLOX2* из 734 проанализированных таким образом зародышей с редактированным геномом в 51 были обнаружены мутации, для верификации которых затем уже проводилось секвенирование. Данный подход позволяет предварительно оценить эффективность редактирования выбранных сайтов благодаря тому, что многие программы дизайна гидовых РНК, недавно рассмотренных нами довольно подробно [Геращенков и др. (Gerashchenkov et al.), 2020], позволяют принимать во внимание потенциальные места узнавания рестрикционных эндонуклеаз.

Использование ASO проб оказалось одним из первых относительно производительных способов детекции полиморфных нуклеотидов в уже известных снипах. Разработка ПЦР в реальном времени и соответствующих ДНК-термоциклеров с оптическим модулем привела к преобразованию вышеописанных ASO проб в их многочисленные разновидности в виде гибридизационных зондов типа TaqMan, Molecular Beacon и им подобным, весьма широко использующихся в настоящее время для генотипирования ОНП, но, как уже говорилось выше, их рассмотрение будет сделано нами в другой статье.

Что касается выявления полиморфных нуклеотидов в снипах в гетеродуплексах с помощью различных химических реагентов, то этот подход все же, помимо вредного воздействия большинства из них на человека, характеризуется низкой производительностью и к тому же зависит от окружающих полиморфный нуклеотид в снипе последовательностей. Использование различных репарирующих эндонуклеаз для детекции мутаций имеет определенные преимущества уже в силу того, что можно детектировать все восемь типов мутаций, не прибегая к токсичным веществам.

Благодарности

Исследование выполнено в рамках государственных заданий №№ 122030200143-8, АААА-А21-121011990119-1 и АААА-А21-121011990120-7, а также при поддержке гранта Минобрнауки РФ (соглашение № 075-15-2021-1066 от 28 сентября 2021 г.).

Литература

1. Гарафутдинов Р.Р., Чемерис Д.А., Сахабутдинова А.Р., Кулуев Б.Р., Чемерис А.В. Разнообразие методов детекции полиморфных нуклеотидов в известных снипах. I. Термины и краткий перечень подходов // Биомика. 2021. Т.13(4). С.434-443. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2021-30
2. Геращенков Г.А., Рожнова Н.А., Кулуев Б.Р., Кирьянова О.Ю., Гумерова Г.Р., Князев А.В., Вершинина З.Р., Михайлова Е.В., Чемерис Д.А., Матниязов Р.Т., Баймиев Ан.Х., Губайдуллин И.М., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. Дизайн РНК-гидов для CRISPR/CAS/ редактирования геномов растений. // Молекулярная биология. 2020. Т.54(1). С.339-353. DOI: 10.31857/S0026898420010061
3. Логвина Н.А., Якубовская М.Г., Долинная Н.Г. Фотометрическая экспресс-детекция частично выведенных из двойной спирали остатков тимина как метод прямого сканирования точечных мутаций и апуриновых сайтов ДНК // Биохимия. 2011. Т.76(2). С. 297-306.
4. Несчастнова АА, Гасанова ВК, Белицкий ГА. и др. Химическое расщепление ДНК-дуплексов с точечными нарушениями комплементарности как основа для выявления мутаций неизвестной локализации // Молекулярная биология. 2007. Т. 41(3). С. 535-543.
5. Чемерис А.В., Аминев Ф.Г., Гарафутдинов Р.Р., Анисимов В.А., Сагитов А.М., Хуснутдинова Э.К., Сахабутдинова А.Р., Чемерис Д.А., Михайленко К.И. ДНК-криминалистика. М.: Наука. 2022. 466 С.
6. Abbas A., Lepelley M., Lechevrel M., Sichel F. Assessment of DHPLC usefulness in the genotyping of GSTP1 exon 5 SNP: comparison to the PCR-RFLP

method // J. Biochem. Biophys. Methods. 2004. V. 59(2). P. 121-126. doi: 10.1016/j.jbbm.2003.12.008.
7. Babon JJ, McKenzie M, Cotton RG. Mutation detection using fluorescent enzyme mismatch cleavage with T4 endonuclease VII // Electrophoresis. 1999. V.20(6). P.1162-1170. doi: 10.1002/(SICI)1522-2683(19990101)20:6<1162::AID-ELPS1162>3.0.CO;2-Y
8. Babon JJ, McKenzie M, Cotton RG. The use of resolvases T4 endonuclease VII and T7 endonuclease I in mutation detection // Mol Biotechnol. 2003. V.23(1). P.73-81. doi: 10.1385/MB:23:1:73
9. Babon JJ, Youil R, Cotton RGH. Improved strategy for mutation detection—a modification to the enzyme mismatch cleavage method // Nucleic Acids Research. 1995. V.23(24). P.5082–5084. doi: 10.1093/nar/23.24.5082
10. Bazakos C, Dulger AO, Uncu AT, Spaniolas S, Spano T, Kalaitzis P. A SNP-based PCR-RFLP capillary electrophoresis analysis for the identification of the varietal origin of olive oils // Food Chem. 2012. V.134(4). P.2411-2418. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.04.031
11. Bugawan TL, Horn GT, Long CM, Mickelson E, Hansen JA, Ferrara GB, Angelini G, Erlich HA. Analysis of HLA-DP allelic sequence polymorphism using the in vitro enzymatic DNA amplification of DP-alpha and DP-beta loci // J Immunol. 1988. V.141(11). P.4024-4030.
12. Bui C.T., Lambrinakos A., Cotton R.G. Spectroscopic study of permanganate oxidation reactions of oligonucleotides containing single base mismatches // Biopolymers. 2003. V. 70(4). P. 628-636. doi: 10.1002/bip.10543.
13. Bui C.T., Rees K., Lambrinakos A., Bedir A., Cotton R.G. Site-selective reactions of imperfectly matched DNA with small chemical molecules: applications in mutation detection // Bioorg. Chem. 2002. V. 30(4). P. 216-232. doi: 10.1016/s0045-2068(02)00019-6.
14. Chang H.W., Cheng Y.H., Chuang L.Y., Yang C.H. SNP-RFLPing 2: an updated and integrated PCR-RFLP tool for SNP genotyping // BMC Bioinformatics. 2010. V. 11. P. 173. doi: 10.1186/1471-2105-11-173.
15. Chang H.W., Yang C.H., Chang P.L., Cheng Y.H., Chuang LY. SNP-RFLPing: restriction enzyme mining for SNPs in genomes // BMC Genomics. 2006. V. 7. P. 30. doi: 10.1186/1471-2164-7-30.
16. Conner BJ, Reyes AA, Morin C, Itakura K, Teplitz RL, Wallace RB. Detection of sickle cell beta S-globin allele by hybridization with synthetic oligonucleotides // Proc Natl Acad Sci USA. 1983. V.80(1). P.278-282. doi: 10.1073/pnas.80.1.278.
17. Cotton RG, Campbell RD. Chemical reactivity of matched cytosine and thymine bases near mismatched and unmatched bases in a heteroduplex between DNA strands with multiple differences // Nucleic Acids Res. 1989. V.17(11). P.4223-4233. doi: 10.1093/nar/17.11.4223
18. Cotton R.G., Rodrigues N.R., Campbell R.D. Reactivity of cytosine and thymine in single-base-pair mismatches with hydroxylamine and osmium tetroxide and its application to the study of mutations // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85(12). P. 4397-4401. doi: 10.1073/pnas.85.12.4397.
19. Cotton R.G. Mutation detection by chemical cleavage // Genet. Anal. 1999. V. 14(5-6). P. 165-168. doi: 10.1016/s1050-3862(98)00021-7.
20. Deeble VJ, Roberts E, Robinson MD, Woods CG, Bishop DT, Taylor GR. Comparison of enzyme mismatch cleavage and chemical cleavage of mismatch on a defined set of heteroduplexes // Genet.Test. 1997-1998. V.1(4). P.253-259. doi: 10.1089/gte.1997.1.253
21. Del Tito BJ Jr, Poff HE 3rd, Novotny MA, Cartledge DM, Walker RI 2nd, Earl CD, Bailey AL. Automated fluorescent analysis procedure for enzymatic mutation detection // Clin Chem. 1998. V.44(4). P.731-739.
22. Deng G.R. A sensitive non-radioactive PCR-RFLP analysis for detecting point mutations at 12th codon of oncogene c-Ha-ras in DNAs of gastric cancer // Nucleic Acids Res. 1988. V. 16(13). P. 6231. doi: 10.1093/nar/16.13.6231.
23. Dong C, Vincent K, Sharp P. Simultaneous mutation detection of three homoeologous genes in wheat by High Resolution Melting analysis and Mutation Surveyor // BMC Plant Biol. 2009. V.9:143. doi: 10.1186/1471-2229-9-143
24. Eiken HG, Odland E, Boman H, Skjelkvåle L, Engebretsen LF, Apold J. Application of natural and amplification created restriction sites for the diagnosis of PKU mutations // Nucleic Acids Res. 1991. V.19(7). P.1427-1430. doi: 10.1093/nar/19.7.1427.
25. Ellis T.P., Humphrey K.E., Smith M.J., Cotton R.G. Chemical cleavage of mismatch: a new look at an established method // Hum. Mutat. 1998. V. 11(5). P. 345-353. doi: 10.1002/(SICI)1098-1004(1998)11:5<345::AID-HUMU1>3.0.CO;2-0.
26. Freson K, Peerlinck K, Aguirre T, Arnout J, Vermylen J, Cassiman JJ, Matthijs G. Fluorescent chemical cleavage of mismatches for efficient screening of the factor VIII gene // HumMutat. 1998. V.11(6). P.470-479. doi: 10.1002/(SICI)1098-1004(1998)11:6<470::AID-HUMU8>3.0.CO;2-A
27. Gao H, Huang J, Barany F, Cao W. Switching base preferences of mismatch cleavage in endonuclease V: an improved method for scanning point mutations // Nucleic Acids Res. 2007. V.35(1). e2. doi: 10.1093/nar/gkl916
28. Gardner S.N., Wagner M.C. Software for optimization of SNP and PCR-RFLP genotyping to

discriminate many genomes with the fewest assays // BMC Genomics. 2005. V. 6. P. 73. doi: 10.1186/1471-2164-6-73.

29. Gasparini P., Bonizzato A., Dognini M., Pignatti P.F. Restriction site generating-polymerase chain reaction (RG-PCR) for the probeless detection of hidden genetic variation: application to the study of some common cystic fibrosis mutations // Mol. Cell. Probes. 1992. V. 6(1). P. 1-7. doi: 10.1016/0890-8508(92)90064-5.

30. Gogos J.A., Karayiorgou M., Aburatani H., Kafatos F.C. Detection of single base mismatches of thymine and cytosine residues by potassium permanganate and hydroxylamine in the presence of tetralkylammonium salts // Nucleic Acids Res. 1990. V. 18(23). P. 6807-6814. doi: 10.1093/nar/18.23.6807.

31. Haliassos A., Chomel J.C., Grandjouan S., Kruh J., Kaplan J.C., Kitzis A. Detection of minority point mutations by modified PCR technique: a new approach for a sensitive diagnosis of tumor-progression markers // Nucleic Acids Res. 1989. V. 17(20). P. 8093-8099. doi: 10.1093/nar/17.20.8093.

32. Haliassos A., Chomel J.C., Tesson L., Baudis M., Kruh J., Kaplan J.C., Kitzis A. Modification of enzymatically amplified DNA for the detection of point mutations // Nucleic Acids Res. 1989a. P. 17(9). P. 3606. doi: 10.1093/nar/17.9.3606.

33. Higuchi R, von Beroldingen CH, Sensabaugh GF, Erlich HA. DNA typing from single hairs // Nature. 1988. V.332(6164). P.543-546. doi: 10.1038/332543a0

34. Hosseini S.Y., Sabahi F., Amini-Bavil-Olyaee S., Alavian S.M., Merat S. A novel accurate ACRS-PCR method with a digestion internal control for identification of wild type and YMDD mutants of hepatitis B virus strains // J. Virol. Methods. 2006. V. 137(2). P. 298-303. doi: 10.1016/j.jviromet.2006.07.008.

35. Huang MC, Cheong WC, Lim LS, Li MH. A simple, high sensitivity mutation screening using Ampligase mediated T7 endonuclease I and Surveyor nuclease with microfluidic capillary electrophoresis // Electrophoresis. 2012. V.33(5). P.788-796. doi: 10.1002/elps.201100460.

36. Jacobson D.R., Moskovits T. Rapid, nonradioactive screening for activating ras oncogene mutations using PCR-primer introduced restriction analysis (PCR-PIRA) // PCR Methods Appl. 1991. V. 1(2). P. 146-148. doi: 10.1101/gr.1.2.146. Erratum in: PCR Methods Appl. 1992. V. 1(4). P. 299.

37. Kamiya Y, Abe F, Mikami M, Endo M, Kawaura K. A rapid method for detection of mutations induced by CRISPR/Cas9-based genome editing in common wheat // Plant Biotechnol (Tokyo). 2020. V.37(2). P.247-251. doi: 10.5511/plantbiotechnology.20.0404b

38. Kaundun S.S., Marchegiani E., Hutchings S.J., Baker K. Derived Polymorphic Amplified Cleaved Sequence (dPACS): A Novel PCR-RFLP Procedure for Detecting Known Single Nucleotide and Deletion-Insertion Polymorphisms // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20(13). P. 3193. doi: 10.3390/ijms20133193.

39. Ke X., Collins A., Ye S. PIRA PCR designer for restriction analysis of single nucleotide polymorphisms // Bioinformatics. 2001. V. 17(9). P. 838-839. doi: 10.1093/bioinformatics/17.9.838.

40. Kulinski J, Besack D, Oleykowski CA, Godwin AK, Yeung AT. CEL I enzymatic mutation detection assay // Biotechniques. 2000. V.29(1). P.44-46, 48. doi: 10.2144/00291bm07

41. Kumar R., Barbacid M. Oncogene detection at the single cell level // Oncogene. 1988. V. 3(6). P. 647-651.

42. Kumar R., Dunn L.L. Designed diagnostic restriction fragment length polymorphisms for the detection of point mutations in ras oncogenes // Oncogene Res. 1989. P. 4(3). P. 235-241.

43. Lambrinakos A., Humphrey K.E., Babon J.J., Ellis T.P., Cotton R.G. Reactivity of potassium permanganate and tetraethylammonium chloride with mismatched bases and a simple mutation detection protocol // Nucleic Acids Res. 1999. V. 27(8). P. 1866-1874. doi: 10.1093/nar/27.8.1866.

44. Li L., Liu J., Xue X., Li Ch., Yang Z., Li T. CAPS/dCAPS Designer: a web-based high-throughput dCAPS marker design tool // Sci. China Life Sci. 2018. V. 61(8). P. 992-995. doi: 10.1007/s11427-017-9286-y.

45. Lien S, Aleström P, Klungland H, Rogne S. Detection of multiple beta-casein (CASB) alleles by amplification created restriction sites (ACRS) // Anim Genet. 1992. V.23(4). P.333-338. doi: 10.1111/j.1365-2052.1992.tb00155.x

46. Mashal R., Koontz, J., Sklar J. Detection of mutations by cleavage of DNA heteroduplexes with bacteriophage resolvases // Nat Genet. 1995. V.9. P.177–183. doi.org/10.1038/ng0295-177

47. Matsubara Y, Kure S. Detection of single nucleotide substitution by competitive allele-specific short oligonucleotide hybridization (CASSOH) with immunochromatographic strip // Hum Mutat. 2003. V.22(2). P.166-12. doi: 10.1002/humu.10247

48. Mean RJ, Pierides A, Deltas CC, Koptides M. Modification of the enzyme mismatch cleavage method using T7 endonuclease I and silver staining // Biotechniques. 2004. V.36(5). P.758-760. doi: 10.2144/04365BM01

49. Neff M.M., Turk E., Kalishman M. Web-based primer design for single nucleotide polymorphism analysis // Trends Genet. 2002. V. 18(12). P. 613-615. doi: 10.1016/s0168-9525(02)02820-2.

50. Oleykowski CA, Bronson Mullins CR, Godwin AK, Yeung AT. Mutation detection using a novel plant endonuclease // Nucleic Acids Res. 1998. V.26. P.4597–4602. doi: 10.1093/nar/26.20.4597

51. Qiu P, Shandilya H, D'Alessio JM, O'Connor K, Durocher J, Gerard GF. Mutation detection using Surveyor nuclease // Biotechniques. 2004. V.36(4). P.702-707. doi: 10.2144/04364PF01.
52. Qiu P, Shandilya H, Gerard GF. A method for clone sequence confirmation using a mismatch-specific DNA endonuclease // Mol Biotechnol. 2005. V.29(1). P.11-18. doi: 10.1385/MB:29:1:11.
53. Pincas H, Pingle MR, Huang J, Lao K, Paty PB, Friedman AM, Barany F. High sensitivity EndoV mutation scanning through real-time ligase proofreading // Nucleic Acids Res. 2004. V.32(19). e148. doi: 10.1093/nar/gnh150
54. Ramus SJ, Cotton RG. Single-tube chemical cleavage of mismatch: successive treatment with hydroxylamine and osmium tetroxide // Biotechniques. 1996. V.21(2). P.216-218, 220. doi: 10.2144/96212bm10.
55. Roberts E., Deeble V.J., Woods C.G., Taylor G.R. Potassium permanganate and tetraethylammonium chloride are a safe and effective substitute for osmium tetroxide in solid-phase fluorescent chemical cleavage of mismatch // Nucleic Acids Res. 1997. V. 25(16). P. 3377-3378. doi: 10.1093/nar/25.16.3377.
56. Rowley G., Saad S., Giannelli F., Green P.M. Ultrarapid mutation detection by multiplex, solid-phase chemical cleavage // Genomics. 1995. V. 30(3). P. 574-582. doi: 10.1006/geno.1995.1279.
57. Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes // Nature. 1986. V.324(6093). P.163-166. doi: 10.1038/324163a0
58. Saleeba JA, Cotton RG. 35S-labelled probes improve detection of mismatched base pairs by chemical cleavage // Nucleic Acids Res. 1991. V.19(7). P.1712. doi: 10.1093/nar/19.7.1712
59. Saleeba JA, Ramus SJ, Cotton RG. Complete mutation detection using unlabeled chemical cleavage // Hum Mutat. 1992. V.1(1). P.63-69. doi: 10.1002/humu.1380010110
60. Sharma A., Changotra H. Mutagenic primer-based PCR-RFLP assay for genotyping IRGM gene promoter variant rs4958843 (C/T) // J. Clin. Lab. Anal. 2018. V. 32(4). e22346. doi: 10.1002/jcla.22346.
61. Smooker PM, Cotton RG. The use of chemical reagents in the detection of DNA mutations // Mutat. Res. 1993. V.288(1). P.65-77. doi: 10.1016/0027-5107(93)90208-w
62. Studencki AB, Conner BJ, Impraim CC, Teplitz RL, Wallace RB. Discrimination among the human beta A, beta S, and beta C-globin genes using allele-specific oligonucleotide hybridization probes // Am J Hum Genet. 1985. V.37(1). P.42-51.
63. Tabone T., Sallmann G., Webb E., Cotton R.G. Detection of 100% of mutations in 124 individuals using a standard UV/Vis microplate reader: a novel concept for mutation scanning // Nucleic Acids Res. 2006. V. 34(6). e45. doi: 10.1093/nar/gkl077.
64. Taranenko N.I., Matteson K.J., Chung C.N., Zhu Y.F., Chang L.Y., Allman S.L., Haff L., Martin S.A., Chen C.H. Laser desorption mass spectrometry for point mutation detection // Genet. Anal. 1996. V. 13(4). P. 87-94. doi: 10.1016/s1050-3862(95)00154-9.
65. Tindall KR, Whitaker RA. Rapid localization of point mutations in PCR products by chemical (HOT) modification // Environ Mol Mutagen. 1991. V.18(4). P.231-8. doi: 10.1002/em.2850180405.
66. Verpy E., Biasotto M., Meo T., Tosi M. Efficient detection of point mutations on color-coded strands of target DNA // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. V. 91(5). P. 1873-1877. doi: 10.1073/pnas.91.5.1873.
67. Voskarides K, Deltas C. Screening for mutations in kidney-related genes using SURVEYOR nuclease for cleavage at heteroduplex mismatches // J. Mol. Diagn. 2009. V.11. P.311–318. doi: 10.2353/jmoldx.2009.080144
68. Vouillot L, Thélie A, Pollet N. Comparison of T7E1 and surveyor mismatch cleavage assays to detect mutations triggered by engineered nucleases // G3 (Bethesda). 2015. V.5(3). P.407-415. doi: 10.1534/g3.114.015834
69. Wang S., Ding M., Duan X., Wang T., Feng X., Wang P., Yao W., Wu Y., Yan Z., Feng F., Yu S., Wang W. Detection of the Single Nucleotide Polymorphism at Position rs2735940 in the Human Telomerase Reverse Transcriptase Gene by the Introduction of a New Restriction Enzyme Site for the PCR-RFLP Assay // Ann. Clin. Lab. Sci. 2017. V. 47(5). P. 546-550.
70. Wang S., Duan X., Wang T., Feng X., Wang P., Yao W., Wu Y., Wu Y., Yan Z., Feng F., Yu S., Wang W. Detection of the rs10250202 polymorphism in protection of telomeres 1 gene through introducing a new restriction enzyme site for PCR-RFLP assay // Springerplus. 2016. V. 5. P. 592. doi: 10.1186/s40064-016-2214-5.
71. Wang W.P., Zhang R.H., Wu P., Wang S., Li R. Estimation of allele frequency in pooled DNA by using PCR-RFLP combined with microchip electrophoresis // J. Chromatogr. B. 2009. V. 877(14-15). P. 1603-1606. doi: 10.1016/j.jchromb.2009.04.001.
72. Yakubovskaya MG, Belyakova AA, Gasanova VK, Belitsky GA, Dolinnaya NG. Comparative reactivity of mismatched and unpaired bases in relation to their type and surroundings. Chemical cleavage of DNA mismatches in mutation detection analysis // Biochimie. 2010. V.92(7). P.762-771. doi: 10.1016/j.biochi.2010.02.016
73. Youil R, Kemper BW, Cotton RG. Screening for mutations by enzyme mismatch cleavage with T4 endonuclease VII // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995.

V.92. P.87-91. doi: 10.1073/pnas.92.1.87
74. Zhang B., Wang Y., Xu X., Guan X., Bai Y. Using PCR-RFLP technology to teach single nucleotide polymorphism for undergraduates // Biochem. Mol. Biol. Educ. 2013. V. 41(4). P. 262-266. doi: 10.1002/bmb.20705.
75. Zhang X., Shao M., Gao L., Zhao Y., Sun Z., Zhou L., Yan Y., Shao Q., Xu W., Qian H. A comprehensive experiment for molecular biology: Determination of single nucleotide polymorphism in human REV3 gene using PCR-RFLP // Biochem. Mol. Biol. Educ. 2017. V. 45(4). P. 299-304. doi: 10.1002/bmb.21037.
76. Zhang X, Yang L, Wang F, Liu Z, Liu R, Ying Q, Fan C, Wu X. Development of a Simple and Cost-Effective Method Based on T7 Endonuclease Cleavage for Detection of Single Nucleotide Polymorphisms // Genet Test Mol Biomarkers. 2018. V.22(12). P.719-723. doi: 10.1089/gtmb.2018.0181

References

1. Abbas A., Lepelley M., Lechevrel M., Sichel F. Assessment of DHPLC usefulness in the genotyping of GSTP1 exon 5 SNP: comparison to the PCR-RFLP method. *J. Biochem. Biophys. Methods*. 2004. V. 59(2). P. 121-126. doi: 10.1016/j.jbbm.2003.12.008.
2. Babon JJ, McKenzie M, Cotton RG. Mutation detection using fluorescent enzyme mismatch cleavage with T4 endonuclease VII. *Electrophoresis*. 1999. V.20(6). P.1162-1170. doi: 10.1002/(SICI)1522-2683(19990101)20:6<1162::AID-ELPS1162>3.0.CO;2-Y
3. Babon JJ, McKenzie M, Cotton RG. The use of resolvases T4 endonuclease VII and T7 endonuclease I in mutation detection. *Mol Biotechnol*. 2003. V.23(1). P.73-81. doi: 10.1385/MB:23:1:73
4. Babon JJ, Youil R, Cotton RGH. Improved strategy for mutation detection—a modification to the enzyme mismatch cleavage method. *Nucleic Acids Research.* 1995. V.23(24). P.5082–5084. doi: 10.1093/nar/23.24.5082
5. Bazakos C, Dulger AO, Uncu AT, Spaniolas S, Spano T, Kalaitzis P. A SNP-based PCR-RFLP capillary electrophoresis analysis for the identification of the varietal origin of olive oils. *Food Chem*. 2012. V.134(4). P.2411-2418. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.04.031
6. Bugawan TL, Horn GT, Long CM, Mickelson E, Hansen JA, Ferrara GB, Angelini G, Erlich HA. Analysis of HLA-DP allelic sequence polymorphism using the in vitro enzymatic DNA amplification of DP-alpha and DP-beta loci. *J Immunol*. 1988. V.141(11). P.4024-4030.
7. Bui C.T., Lambrinakos A., Cotton R.G. Spectroscopic study of permanganate oxidation reactions of oligonucleotides containing single base mismatches. *Biopolymers.* 2003. V. 70(4). P. 628-636. doi: 10.1002/bip.10543.
8. Bui C.T., Rees K., Lambrinakos A., Bedir A., Cotton R.G. Site-selective reactions of imperfectly matched DNA with small chemical molecules: applications in mutation detection. *Bioorg. Chem*. 2002. V. 30(4). P. 216-232. doi: 10.1016/s0045-2068(02)00019-6.
9. Chang H.W., Cheng Y.H., Chuang L.Y., Yang C.H. SNP-RFLPing 2: an updated and integrated PCR-RFLP tool for SNP genotyping. *BMC Bioinformatics*. 2010. V. 11. P. 173. doi: 10.1186/1471-2105-11-173.
10. Chang H.W., Yang C.H., Chang P.L., Cheng Y.H., Chuang LY. SNP-RFLPing: restriction enzyme mining for SNPs in genomes. *BMC Genomics*. 2006. V. 7. P. 30. doi: 10.1186/1471-2164-7-30.
11. Chemeris A.V., Aminev F.G., Garafutdinov R.R., Anisimov V.A., SagitovA.M., Khusnutdinova E.K., Sakhabutdinova A.R., Chemeris D.A., Mihaylenko K.I. DNK-kriminalistika. M.: Nauka. 2022. 466 S. [DNA criminalistics] (In Russian)
12. Conner BJ, Reyes AA, Morin C, Itakura K, Teplitz RL, Wallace RB. Detection of sickle cell beta S-globin allele by hybridization with synthetic oligonucleotide. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1983. V.80(1). P.278-282. doi: 10.1073/pnas.80.1.278.
13. Cotton RG, Campbell RD. Chemical reactivity of matched cytosine and thymine bases near mismatched and unmatched bases in a heteroduplex between DNA strands with multiple differences. *Nucleic Acids Res*. 1989. V.17(11). P.4223-4233. doi: 10.1093/nar/17.11.4223
14. Cotton R.G., Rodrigues N.R., Campbell R.D. Reactivity of cytosine and thymine in single-base-pair mismatches with hydroxylamine and osmium tetroxide and its application to the study of mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1988. V. 85(12). P. 4397-4401. doi: 10.1073/pnas.85.12.4397.
15. Cotton R.G. Mutation detection by chemical cleavage. *Genet. Anal*. 1999. V. 14(5-6). P. 165-168. doi: 10.1016/s1050-3862(98)00021-7.
16. Deeble VJ, Roberts E, Robinson MD, Woods CG, Bishop DT, Taylor GR. Comparison of enzyme mismatch cleavage and chemical cleavage of mismatch on a defined set of heteroduplexes. *Genet.Test.* 1997-1998. V.1(4). P.253-259. doi: 10.1089/gte.1997.1.253
17. Del Tito BJ Jr, Poff HE 3rd, Novotny MA, Cartledge DM, Walker RI 2nd, Earl CD, Bailey AL. Automated fluorescent analysis procedure for enzymatic mutation detection. *Clin Chem*. 1998. V.44(4). P.731-739.
18. Deng G.R. A sensitive non-radioactive PCR-RFLP analysis for detecting point mutations at 12th codon of oncogene c-Ha-ras in DNAs of gastric cancer. *Nucleic Acids Res*. 1988. V. 16(13). P. 6231. doi: 10.1093/nar/16.13.6231.
19. Dong C, Vincent K, Sharp P. Simultaneous

mutation detection of three homoeologous genes in wheat by High Resolution Melting analysis and Mutation Surveyor. *BMC Plant Biol*. 2009. V.9:143. doi: 10.1186/1471-2229-9-143

20. Eiken HG, Odland E, Boman H, Skjelkvåle L, Engebretsen LF, Apold J. Application of natural and amplification created restriction sites for the diagnosis of PKU mutations. *Nucleic Acids Res.* 1991. V.19(7). P.1427-1430. doi: 10.1093/nar/19.7.1427.
21. Ellis T.P., Humphrey K.E., Smith M.J., Cotton R.G. Chemical cleavage of mismatch: a new look at an established method. *Hum. Mutat*. 1998. V. 11(5). P. 345-353. doi: 10.1002/(SICI)1098-1004(1998)11:5<345::AID-HUMU1>3.0.CO;2-0.
22. Freson K, Peerlinck K, Aguirre T, Arnout J, Vermylen J, Cassiman JJ, Matthijs G. Fluorescent chemical cleavage of mismatches for efficient screening of the factor VIII gene. *Hum Mutat*. 1998. V.11(6). P.470-479. doi: 10.1002/(SICI)1098-1004(1998)11:6<470::AID-HUMU8>3.0.CO;2-A
23. Gao H, Huang J, Barany F, Cao W. Switching base preferences of mismatch cleavage in endonuclease V: an improved method for scanning point mutations. *Nucleic Acids Res*. 2007. V.35(1). e2. doi: 10.1093/nar/gkl916
24. Garafutdinov R.R., Chemeris D.A., Sakhabutdinova A.R., Kuluev B.R., Chemeris A.V. The diversity of methods for the detection of polymorphic nucleotides in the known SNPs. I. Terms and brief list of approaches. *Biomics*. 2021. V.13(4). P.434-443. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2021-30 (In Russian)
25. Gardner S.N., Wagner M.C. Software for optimization of SNP and PCR-RFLP genotyping to discriminate many genomes with the fewest assays. *BMC Genomics*. 2005. V. 6. P. 73. doi: 10.1186/1471-2164-6-73.
26. Gasparini P., Bonizzato A., Dognini M., Pignatti P.F. Restriction site generating-polymerase chain reaction (RG-PCR) for the probeless detection of hidden genetic variation: application to the study of some common cystic fibrosis mutations. *Mol. Cell. Probes*. 1992. V. 6(1). P. 1-7. doi: 10.1016/0890-8508(92)90064-5.
27. Gerashchenkov G.A., Rozhnova N.A., Kuluev B.R., Kiryanova O.Yu., Gumerova G.R., Knyazev A.V., Vershinina Z.R., Mikhailova E.V., Chemeris D.A., Matniyazov R.T., Baimiev An.Kh., Gubaidullin I.M., Baimiev Al.Kh., Chemeris A.V. Design of Guide RNA for CRISPR/Cas Plant Genome Editing. *Mol Biol (Mosk).* 2020. V.54(1) P.24-42. doi: 10.1134/S0026893320010069
28. Gogos J.A., Karayiorgou M., Aburatani H., Kafatos F.C. Detection of single base mismatches of thymine and cytosine residues by potassium permanganate and hydroxylamine in the presence of tetralkylammonium salts. *Nucleic Acids Res*. 1990. V. 18(23). P. 6807-6814. doi: 10.1093/nar/18.23.6807.
29. Haliassos A., Chomel J.C., Grandjouan S., Kruh J., Kaplan J.C., Kitzis A. Detection of minority point mutations by modified PCR technique: a new approach for a sensitive diagnosis of tumor-progression markers. *Nucleic Acids Res*. 1989. V. 17(20). P. 8093-8099. doi: 10.1093/nar/17.20.8093.
30. Haliassos A., Chomel J.C., Tesson L., Baudis M., Kruh J., Kaplan J.C., Kitzis A. Modification of enzymatically amplified DNA for the detection of point mutations. *Nucleic Acids Res*. 1989a. P. 17(9). P. 3606. doi: 10.1093/nar/17.9.3606.
31. Higuchi R, von Beroldingen CH, Sensabaugh GF, Erlich HA. DNA typing from single hairs. *Nature*. 1988. V.332(6164). P.543-546. doi: 10.1038/332543a0
32. Hosseini S.Y., Sabahi F., Amini-Bavil-Olyaee S., Alavian S.M., Merat S. A novel accurate ACRS-PCR method with a digestion internal control for identification of wild type and YMDD mutants of hepatitis B virus strains. *J. Virol. Methods*. 2006. V. 137(2). P. 298-303. doi: 10.1016/j.jviromet.2006.07.008.
33. Huang MC, Cheong WC, Lim LS, Li MH. A simple, high sensitivity mutation screening using Ampligase mediated T7 endonuclease I and Surveyor nuclease with microfluidic capillary electrophoresis. *Electrophoresis.* 2012. V.33(5). P.788-796. doi: 10.1002/elps.201100460.
34. Jacobson D.R., Moskovits T. Rapid, nonradioactive screening for activating ras oncogene mutations using PCR-primer introduced restriction analysis (PCR-PIRA). *PCR Methods Appl.* 1991. V. 1(2). P. 146-148. doi: 10.1101/gr.1.2.146. Erratum in: PCR Methods Appl. 1992. V. 1(4). P. 299.
35. Kamiya Y, Abe F, Mikami M, Endo M, Kawaura K. A rapid method for detection of mutations induced by CRISPR/Cas9-based genome editing in common wheat. *Plant Biotechnol (Tokyo).* 2020. V.37(2). P.247-251. doi: 10.5511/plantbiotechnology.20.0404b
36. Kaundun S.S., Marchegiani E., Hutchings S.J., Baker K. Derived Polymorphic Amplified Cleaved Sequence (dPACS): A Novel PCR-RFLP Procedure for Detecting Known Single Nucleotide and Deletion-Insertion Polymorphisms. *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20(13). P. 3193. doi: 10.3390/ijms20133193.
37. Ke X., Collins A., Ye S. PIRA PCR designer for restriction analysis of single nucleotide polymorphisms. *Bioinformatics*. 2001. V. 17(9). P. 838-839. doi: 10.1093/bioinformatics/17.9.838.
38. Kulinski J, Besack D, Oleykowski CA, Godwin AK, Yeung AT. CEL I enzymatic mutation detection assay. *Biotechniques*. 2000. V.29(1). P.44-46, 48. doi: 10.2144/00291bm07
39. Kumar R., Barbacid M. Oncogene detection at the single cell level. *Oncogene*. 1988. V. 3(6). P. 647-651.
40. Kumar R., Dunn L.L. Designed diagnostic

restriction fragment length polymorphisms for the detection of point mutations in ras oncogenes. *Oncogene* Res. 1989. P. 4(3). P. 235-241.

41. Lambrinakos A., Humphrey K.E., Babon J.J., Ellis T.P., Cotton R.G. Reactivity of potassium permanganate and tetraethylammonium chloride with mismatched bases and a simple mutation detection protocol. *Nucleic Acids Res*. 1999. V. 27(8). P. 1866-1874. doi: 10.1093/nar/27.8.1866.
42. Li L., Liu J., Xue X., Li Ch., Yang Z., Li T. CAPS/dCAPS Designer: a web-based high-throughput dCAPS marker design tool. *Sci. China Life Sci*. 2018. V. 61(8). P. 992-995. doi: 10.1007/s11427-017-9286-y.
43. Lien S, Aleström P, Klungland H, Rogne S. Detection of multiple beta-casein (CASB) alleles by amplification created restriction sites (ACRS). *Anim Genet.* 1992. V.23(4). P.333-338. doi: 10.1111/j.1365-2052.1992.tb00155.x
44. Logvina NA, Yakubovskaya MG, Dolinnaya NG. Rapid photometric detection of thymine residues partially flipped out of double helix as a method for direct scanning of point mutations and apurinic DNA sites. *Biochemistry (Mosc).* 2011. V.76(2). P.245-252. doi: 10.1134/s0006297911020118
45. Mashal R., Koontz, J., Sklar J. Detection of mutations by cleavage of DNA heteroduplexes with bacteriophage resolvases. *Nat Genet*. 1995. V.9. P.177–183. doi.org/10.1038/ng0295-177
46. Matsubara Y, Kure S. Detection of single nucleotide substitution by competitive allele-specific short oligonucleotide hybridization (CASSOH) with immunochromatographic strip. *Hum Mutat*. 2003. V.22(2). P.166-12. doi: 10.1002/humu.10247
47. Mean RJ, Pierides A, Deltas CC, Koptides M. Modification of the enzyme mismatch cleavage method using T7 endonuclease I and silver staining. *Biotechniques*. 2004. V.36(5). P.758-760. doi: 10.2144/04365BM01
48. Neff M.M., Turk E., Kalishman M. Web-based primer design for single nucleotide polymorphism analysis. *Trends Genet.* 2002. V. 18(12). P. 613-615. doi: 10.1016/s0168-9525(02)02820-2.
49. Neschastnova A.A., Yakubovskaya M.G., Gasanova V.K. et al. Chemical cleavage of DNA duplexes with single base mismatches as a basis for detection of random point mutations. *Mol.Biol*. 2007. V.41, P.477–484. doi: 10.1134/S0026893307030144
50. Oleykowski CA, Bronson Mullins CR, Godwin AK, Yeung AT. Mutation detection using a novel plant endonuclease. *Nucleic Acids Res*. 1998. V.26. P.4597–4602. doi: 10.1093/nar/26.20.4597
51. Pincas H, Pingle MR, Huang J, Lao K, Paty PB, Friedman AM, Barany F. High sensitivity EndoV mutation scanning through real-time ligase proofreading. *Nucleic Acids Res*. 2004. V.32(19). e148. doi: 10.1093/nar/gnh150
52. Qiu P, Shandilya H, D'Alessio JM, O'Connor K, Durocher J, Gerard GF. Mutation detection using Surveyor nuclease. *Biotechniques*. 2004. V.36(4). P.702-707. doi: 10.2144/04364PF01.
53. Qiu P, Shandilya H, Gerard GF. A method for clone sequence confirmation using a mismatch-specific DNA endonuclease. *Mol Biotechnol*. 2005. V.29(1). P.11-18. doi: 10.1385/MB:29:1:11.
54. Ramus SJ, Cotton RG. Single-tube chemical cleavage of mismatch: successive treatment with hydroxylamine and osmium tetroxide. *Biotechniques*. 1996. V.21(2). P.216-218, 220. doi: 10.2144/96212bm10.
55. Roberts E., Deeble V.J., Woods C.G., Taylor G.R. Potassium permanganate and tetraethylammonium chloride are a safe and effective substitute for osmium tetroxide in solid-phase fluorescent chemical cleavage of mismatch. *Nucleic Acids Res*. 1997. V. 25(16). P. 3377-3378. doi: 10.1093/nar/25.16.3377.
56. Rowley G., Saad S., Giannelli F., Green P.M. Ultrarapid mutation detection by multiplex, solid-phase chemical cleavage. *Genomics*. 1995. V. 30(3). P. 574-582. doi: 10.1006/geno.1995.1279.
57. Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature*. 1986. V.324(6093). P.163-166. doi: 10.1038/324163a0
58. Saleeba JA, Cotton RG. 35S-labelled probes improve detection of mismatched base pairs by chemical cleavage. *Nucleic Acids Res*. 1991. V.19(7). P.1712. doi: 10.1093/nar/19.7.1712
59. Saleeba JA, Ramus SJ, Cotton RG. Complete mutation detection using unlabeled chemical cleavage. *Hum.Mutat*. 1992. V.1(1). P.63-69. doi: 10.1002/humu.1380010110
60. Sharma A., Changotra H. Mutagenic primer-based PCR-RFLP assay for genotyping IRGM gene promoter variant rs4958843 (C/T). *J. Clin. Lab. Anal.* 2018. V. 32(4). e22346. doi: 10.1002/jcla.22346.
61. Smooker PM, Cotton RG. The use of chemical reagents in the detection of DNA mutations. *Mutat.Res*. 1993. V.288(1). P.65-77. doi: 10.1016/0027-5107(93)90208-w
62. Studencki AB, Conner BJ, Impraim CC, Teplitz RL, Wallace RB. Discrimination among the human beta A, beta S, and beta C-globin genes using allele-specific oligonucleotide hybridization probes. *Am J Hum Genet*. 1985. V.37(1). P.42-51.
63. Tabone T., Sallmann G., Webb E., Cotton R.G. Detection of 100% of mutations in 124 individuals using a standard UV/Vis microplate reader: a novel concept for mutation scanning. *Nucleic Acids Res*. 2006. V. 34(6). e45. doi: 10.1093/nar/gkl077.
64. Taranenko N.I., Matteson K.J., Chung C.N., Zhu

Y.F., Chang L.Y., Allman S.L., Haff L., Martin S.A., Chen C.H. Laser desorption mass spectrometry for point mutation detection. *Genet. Anal*. 1996. V. 13(4). P. 87-94. doi: 10.1016/s1050-3862(95)00154-9.

65. Tindall KR, Whitaker RA. Rapid localization of point mutations in PCR products by chemical (HOT) modification. *Environ Mol Mutagen*. 1991. V.18(4). P.231-8. doi: 10.1002/em.2850180405.

66. Verpy E., Biasotto M., Meo T., Tosi M. Efficient detection of point mutations on color-coded strands of target DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994. V. 91(5). P. 1873-1877. doi: 10.1073/pnas.91.5.1873.

67. Voskarides K, Deltas C. Screening for mutations in kidney-related genes using SURVEYOR nuclease for cleavage at heteroduplex mismatches. *J. Mol. Diagn*. 2009. V.11. P.311–318. doi: 10.2353/jmoldx.2009.080144

68. Vouillot L, Thélie A, Pollet N. Comparison of T7E1 and surveyor mismatch cleavage assays to detect mutations triggered by engineered nucleases. *G3 (Bethesda).* 2015. V.5(3). P.407-415. doi: 10.1534/g3.114.015834

69. Wang S., Ding M., Duan X., Wang T., Feng X., Wang P., Yao W., Wu Y., Yan Z., Feng F., Yu S., Wang W. Detection of the Single Nucleotide Polymorphism at Position rs2735940 in the Human Telomerase Reverse Transcriptase Gene by the Introduction of a New Restriction Enzyme Site for the PCR-RFLP Assay. *Ann. Clin. Lab. Sci*. 2017. V. 47(5). P. 546-550.

70. Wang S., Duan X., Wang T., Feng X., Wang P., Yao W., Wu Y., Wu Y., Yan Z., Feng F., Yu S., Wang W. Detection of the rs10250202 polymorphism in protection of telomeres 1 gene through introducing a new restriction enzyme site for PCR-RFLP assay. *Springerplus*. 2016. V. 5. P. 592. doi: 10.1186/s40064-016-2214-5.

71. Wang W.P., Zhang R.H., Wu P., Wang S., Li R. Estimation of allele frequency in pooled DNA by using PCR-RFLP combined with microchip electrophoresis. *J. Chromatogr. B.* 2009. V. 877(14-15). P. 1603-1606. doi: 10.1016/j.jchromb.2009.04.001.

72. Yakubovskaya MG, Belyakova AA, Gasanova VK, Belitsky GA, Dolinnaya NG. Comparative reactivity of mismatched and unpaired bases in relation to their type and surroundings. Chemical cleavage of DNA mismatches in mutation detection analysis. *Biochimie*. 2010. V.92(7). P.762-771. doi: 10.1016/j.biochi.2010.02.016

73. Youil R, Kemper BW, Cotton RG. Screening for mutations by enzyme mismatch cleavage with T4 endonuclease VII. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995. V.92. P.87-91. doi: 10.1073/pnas.92.1.87

74. Zhang B., Wang Y., Xu X., Guan X., Bai Y. Using PCR-RFLP technology to teach single nucleotide polymorphism for undergraduates. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* 2013. V. 41(4). P. 262-266. doi: 10.1002/bmb.20705.

75. Zhang X., Shao M., Gao L., Zhao Y., Sun Z., Zhou L., Yan Y., Shao Q., Xu W., Qian H. A comprehensive experiment for molecular biology: Determination of single nucleotide polymorphism in human REV3 gene using PCR-RFLP. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* 2017. V. 45(4). P. 299-304. doi: 10.1002/bmb.21037.

76. Zhang X, Yang L, Wang F, Liu Z, Liu R, Ying Q, Fan C, Wu X. Development of a Simple and Cost-Effective Method Based on T7 Endonuclease Cleavage for Detection of Single Nucleotide Polymorphisms. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2018. V.22(12). P.719-723. doi: 10.1089/gtmb.2018.0181