



СТРУКТУРА ПРОДУКТОВ КЛАССИЧЕСКОЙ ПЦР И ПРИЧИНЫ ВЫХОДА РЕАКЦИИ НА ПЛАТО

¹Гарафутдинов Р.Р., ²Чемерис Д.А., ³Михайленко К.И., ⁴Зубов В.В., ¹Чемерис А.В.

¹Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра
Российской академии наук, Уфа, Россия, E-mail: garafutdinovr@mail.ru

²ООО «ГЕНВЕД», Москва, Россия

³Институт механики Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия

⁴ООО «ИзоГель», Пушкино, Московская область, Россия

Резюме

Классическая ПЦР с двумя праймерами обеспечивает обычно наработку одного целевого ампликона. Однако несмотря на кажущуюся простоту этой реакции, при ее протекании неизбежно синтезируются дополнительные продукты разной длины и строения даже при использовании идеальных праймеров. Этим второстепенным продуктам не уделяют должного внимания, но в отдельных случаях они могут заметно влиять на эффективность ПЦР, а также способствовать более раннему выходу реакции на плато, обусловленному несколькими причинами. В качестве основной выступает снижение эффективности отжига праймеров на цепях целевого ампликона за счет увеличения количества последнего в ходе ПЦР и, соответственно, повышения вероятности реассоциации его цепей. Для описания протекающих в ходе ПЦР процессов предложено оперировать условной реакционной ячейкой объемом 1 зептолитр (1000 нм³), вмещающей четвертичные комплексы «ДНК/праймер/ДНК-полимераза/дНТФ». Рассчитано количество необходимых для протекания ПЦР молекул ингредиентов, приходящееся на подобную реакционную ячейку.

Ключевые слова: ПЦР, ампликон, ДНК-полимераза, праймер, плато, термоконвекция, зептолитр

Цитирование: Гарафутдинов Р.Р., Чемерис Д.А., Михайленко К.И., Зубов В.В., Чемерис А.В. Структура продуктов классической ПЦР и причины выхода реакции на плато // *Biomics*. 2024. Т.16(1). С. 18-32. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2024-3

© Авторы

STRUCTURE OF THE PRODUCTS OF CLASSICAL PCR AND THE REASONS FOR THE PLATEAU OF THE REACTION

¹Garafutdinov R.R., ²Chemeric D.A., ³Mikhailenko K.I., ⁴Zubov V.V., ¹Chemeric A.V.

¹Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Centre,
Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia, E-mail: garafutdinovr@mail.ru

²GENVED LLC, Moscow, Russia

³Institute of Mechanics, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences,

⁴IsoGel LLC, Pushchino, Moscow District, Russia

Resume

Classical PCR with two primers usually produces one amplicon. However, despite the apparent

simplicity of this reaction, additional products of different lengths and structures are inevitably synthesized, even when ideal primers are used. These minor products are not given enough attention, but in some cases they can significantly affect the efficiency of PCR, and also contribute to an earlier plateau of the reaction, due to several reasons. The main one is a decrease in the efficiency of primer annealing on the chains of the target amplicon due to an increase in its quantity during PCR and, therefore, an increase in the probability of reassociation of its chains. To describe the processes occurring during PCR, it is proposed to operate with a conventional reaction cell with a volume of 1 zeptoliter (1000 nm^3), containing quaternary complexes "DNA/primer/DNA polymerase/dNTP". The number of ingredient molecules required for PCR to occur per such reaction cell was calculated.

Keywords: PCR, amplicon, DNA polymerase, primer, plateau, thermal convection, zeptoliter

Citation: Garafutdinov R.R., Chemeris D.A., Mikhailenko K.I., Zubov V.V., Chemeris A.V. Structure of the products of classical PCR and the reasons for the plateau of the reaction. *Biomcs*. 2024. V.16(1). P.18-32. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2024-3 (In Russian)

© The Authors

Введение

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) была разработана в 80-х гг. прошлого столетия [Saiki et al., 1985; Mullis, Faloona, 1987] и быстро стала одним из наиболее важных методов современной биологической науки, а также нашла практическое применение в молекулярной диагностике. Разработка ПЦР была по достоинству оценена присуждением К.Мюллису в 1993 г. Нобелевской премии по химии. В настоящее время ПЦР используется не только в научных исследованиях в биологии и медицине, но и в смежных областях, например, в ДНК-криминалистике [Чемерис и др. (Chemeris et al.), 2022] и для долговременного хранения небологических данных в ДНК [Garafutdinov et al., 2022]. Столь широкое распространение ПЦР отчасти объясняется относительной простотой данной реакции, но на самом деле простота эта только кажущаяся.

Важной особенностью ПЦР является необходимость циклической смены температурных режимов для обеспечения последовательной денатурации двуцепочечных ДНК (дцДНК), отжига на них олигонуклеотидных праймеров и элонгации последних под действием ДНК-полимеразы. Фактически этапы денатурации, отжига и элонгации составляют один цикл ПЦР. На стадии отжига сначала образуется комплекс из матричной цепи ДНК и праймера-затравки, а после "закрепления" ДНК-полимеразы на свободном 3'-конце праймера (или удлиняемой цепи ДНК) возникает третичный комплекс. Во время элонгации при присоединении комплементарных матрице нуклеотидов образуются комплексы с соответствующими дНТФ. Собственно, такие четвертичные комплексы формируются уже на стадии отжига, температура которого иногда совпадает с температурой этапа элонгации.

Следующий цикл начинается с термической денатурации дцДНК и разрушения образовавшихся комплексов.

В ходе ПЦР синтезируются целевые продукты амплификации различных типов – фрагменты ДНК, называемые ампликонами¹. Их количества сильно разнятся, и в ряде случаев это необходимо учитывать. Часть продуктов оказывает определенное воздействие на протекание ПЦР при неизбежном выходе этой реакции на плато. Были сделаны разные предположения о причинах, приводящих к снижению эффективности ПЦР [Morrison, Gannon, 1994; Kainz, 2000; Jansson, Hedman, 2019], однако единого мнения на этот счет до сих пор нет.

Рассмотрению этих вопросов и посвящена данная статья; различным аспектам количественной ПЦР, в том числе цифровой, внимание уделяться здесь не будет за исключением демонстрации накопления продуктов ПЦР в режиме реального времени.

¹ Термин "amplicon" для продуктов ПЦР предложен самим Мюллисом в 1991 г. [Mullis, 1991]. При этом он отметил, что услышал это слово на одной из конференций и оно ему понравилось. Первоначально термином "amplicon" называли векторную конструкцию, улучшающую клонирование [Spaete, Frenkel, 1982]. Некоторое время для обозначения продуктов ПЦР использовалось слово "amplificate" (русс. «амплификат»), однако данным термином, на наш взгляд, удобнее обозначать реакционную смесь после проведенной ПЦР, содержащую любые продукты амплификации (в том числе неспецифические).

Основные типы продуктов ПЦР

ПЦР – ферментативная реакция, в которой под действием термостабильной ДНК-полимеразы происходит репликация цепей присутствующей в растворе анализируемой/амплифицируемой ДНК. Другими ингредиентами реакционной смеси для классической ПЦР служат олигонуклеотидные праймеры, дезоксинуклеозидтрифосфаты (дНТФ), ионы магния (кофакторы ДНК-полимеразы), калия или натрия, а также буферная соль и неионный детергент. Олигонуклеотидных праймеров обычно используется два: так называемые прямой (forward) и обратный (reverse) праймеры. В ряде случаев в реакционные смеси добавляют некие агенты – ПЦР-энхансеры, повышающие эффективность ПЦР [Sakhabutdinova et al., 2021; Сахабутдинова и др. (Sakhabutdinova et al.), 2023].

Реакция начинается с перевода исходных молекул дцДНК в одноцепочечное состояние путем денатурации под действием высокой температуры (обычно при 94-96°C). Далее следует этап отжига олигонуклеотидных праймеров (обычно длиной от 8 до 30 нт в зависимости от эксперимента²), способных при снижении температуры сформировать дуплекс с одноцепочечной ДНК в местах, где для них обнаружатся комплементарные последовательности нуклеотидов. В зависимости от длины праймеров и их GC-состава температура отжига может заметно варьировать, например, от 30 до 70°C, хотя обычно используется диапазон 50-60°C. Затем на этапе элонгации происходит удлинение отжигшихся праймеров под действием ДНК-полимеразы (обычно при температуре 68-75°C в зависимости от фермента). Продолжительность этапов может существенно варьировать (от нескольких секунд до минут) в зависимости от задач и длины амплифицируемых фрагментов.

На рисунке 1 приведена схема, на которой показаны две антипараллельные цепи исходной ДНК-матрицы с отождествленными на них праймерами³: прямым P_f (forward Primer) и обратным P_r (reverse Primer), ограничивающими участок ДНК, часто называемый мишенью. Ее размер может варьировать в очень широких пределах (от нескольких десятков пар до нескольких десятков тысяч пар нуклеотидов). На

² особенностям ПЦР-праймеров и программам для их дизайна посвящены другие наши статьи [Чемерис и др. (Chemeris et al.), 2015; Гарифутдинов и др. (Garafutdinov et al.), 2019]

³ На рис. 1 и 3 праймеры изображены со стрелками на 3'-концах, а в образующихся продуктах, служащих в следующих циклах матрицами для репликации ДНК, участки праймеров отделяются вертикальными черточками.

рисунке 1 цепи ДНК изображены как условно верхняя (обозначена как L_u – upper Long) и условно нижняя (обозначена как L_l – lower Long) в направлениях 5'→3' и 3'→5', соответственно. Разрывы символизируют участок неизвестной длины. В первом цикле после денатурации цепей ДНК, отжига на них праймеров и их элонгации образуются новые цепи M_l и M_u (Medium lower и Medium upper), длина которых зависит от процессивности ДНК-полимеразы и от продолжительности элонгации. Данные цепи имеют один четко детерминированный конец, определяемый соответствующим праймером; второй их конец недетерминирован, поэтому продукты M_l и M_u будут гетерогенными по размеру.

По завершении каждого цикла ПЦР теоретически должно происходить двукратное увеличение количества молекул целевых ампликонов, т.е. их накопление происходит в геометрической прогрессии 2^n . Через 30 циклов реакции количество копий мишени должно увеличиться приблизительно в миллиард раз ($2^{30} = 1073741824$). На практике такого увеличения не наблюдается: реакция после фазы экспоненциального накопления продуктов реакции (рис. 2, фазы I и II) замедляется (рис. 2, фаза III) и выходит на плато (рис. 2, фаза IV) в силу различных причин. Время выхода на плато, как и стадия накопления инструментально детектируемого количества продуктов ПЦР происходит для разных образцов по достижении разного количества циклов (рис. 2, кривые 1 и 2), в первую очередь из-за разницы в количестве копий мишени⁴.

В ходе ПЦР в реакционной смеси накапливаются продукты нескольких типов, среди которых, помимо целевых ампликонов, имеются побочные молекулы ДНК, представленные в гораздо меньшем количестве. Для упрощения будем рассматривать потомков только одной из цепей ДНК (L_u), считая, что реакция идет симметрично⁵ (рис. 3). Будем считать, что используются идеальные праймеры: с равной температурой отжига, отжигающиеся на матрице только в положенных местах и не образующие побочных вторичных структур, способных давать неспецифические ампликоны (например, димеры [Garafutdinov et al., 2020]). Примем также, что ДНК-полимераза не теряет своей активности, не допускает ошибок при репликации, переключения матриц и ингибирования синтеза ДНК не происходит, а ДНК не подвергается высокотемпературному разрушению.

⁴ важное значение имеет также чистота ДНК-препаратов (отсутствие ингибиторов ДНК-полимераз)

⁵ так называемая асимметричная ПЦР, в которой один из праймеров представлен в заметно меньшем количестве, протекает иначе

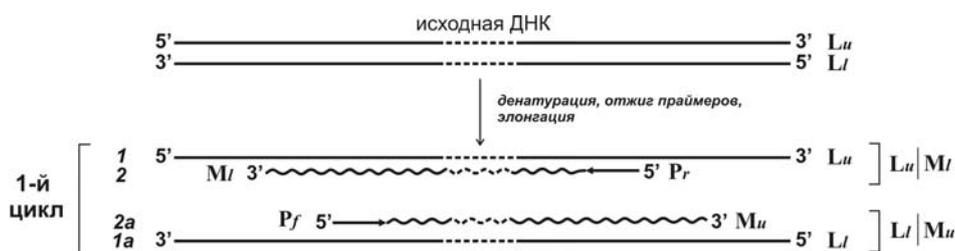


Рис. 1. Схема протекания первого цикла ПЦР. Изображены две антипараллельные цепи ДНК: L_u (*upper Long*) – исходная условно верхняя цепь, и L_l (*lower Long*) – исходная условно нижняя цепь. P_f (*forward Primer*) – прямой праймер, P_r (*reverse Primer*) – обратный праймер. Элонгация праймеров показана волнистыми линиями. M_l (*lower Medium*) и M_u (*upper Medium*) – цепи ДНК, образующиеся в первом цикле при удлинении праймеров (остальные пояснения в тексте).

Fig. 1. The scheme of the first PCR cycle. Two antiparallel DNA chains are shown: L_u (*upper Long*) is an initial upper DNA chain, L_l (*lower Long*) is an initial lower DNA chain. P_f (*forward Primer*) is a direct primer, P_r (*reverse Primer*) is a reverse primer. Primers elongation is shown by wavy lines. M_l (*lower Medium*) and M_u (*upper Medium*) are DNA chains formed at the first PCR cycle via primers elongation (other explanations are in the text).

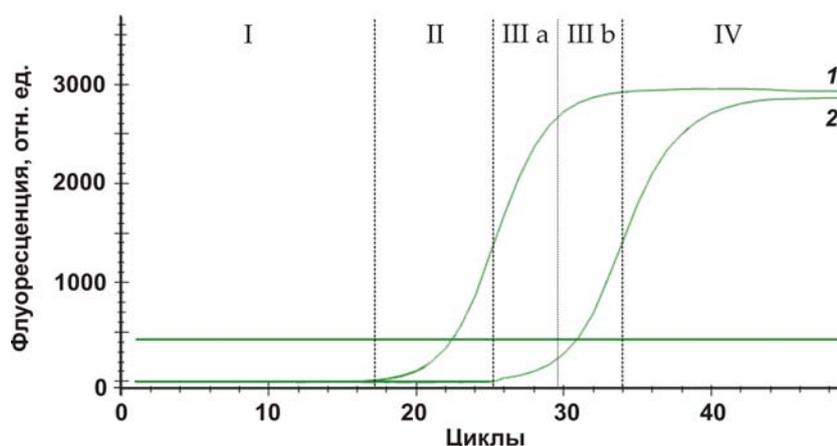


Рис. 2. Кинетика ПЦР-амплификации. Реакция проходит следующие фазы: I – экспоненциальное накопление инструментально недетектируемого количества продуктов, II – экспоненциальное накопление инструментально детектируемого количества продуктов, IIIa – замедление накопления продуктов, IIIb – завершение накопления продуктов, IV – отсутствие накопления продуктов (плато). Кривые 1 и 2 соответствуют разным ПЦР-образцам, отличающимся стартовым количеством копий мишени.

Fig. 2. Kinetics of PCR amplification. The reaction passes the following stages: I - exponential accumulation of an instrumentally undetectable amount of products, II - exponential accumulation of an instrumentally detectable amount of products, IIIa - reduction of product accumulation, IIIb - completion of product accumulation, IV - no accumulation of products (plateau). Curves 1 and 2 correspond to PCR samples that differ in the initial number of target copies.

Во втором цикле после этапов денатурации/отжига, помимо исходной ДНК, на образовавшейся в первом цикле цепи M_l отожжется праймер P_f , элонгация которого приведет к формированию нового типа цепей ДНК меньшего размера, обозначенных нами как S_u (*Short*, подстрочный значок *u* (*upper*) указывает на то, что это фрагмент верхней цепи ДНК). В ПЦР-продуктах, служащих в следующих циклах матрицами для репликации ДНК, участки праймерных последовательностей отделяются вертикальными

черточками.

В третьем цикле ПЦР после денатурации будут иметься несколько типов ДНК-матриц: одна копия исходной цепи ДНК L_u , две копии M_l (продукт удлинения праймера на исходной цепи ДНК в первом и втором циклах), одна копия S_u (продукт удлинения праймера на цепи M_l). После отжига и элонгации в реакционной смеси к концу третьего цикла будут находиться гетерогенные по длине своих одно/двухцепочечных участков продукты ПЦР: $L_u|M_l$, $M_l|S_u$, и продукт с цепями одинакового размера $S_u|S_l$.

Продукт $S_u|S_l$ (равно как и аналогичный продукт амплификации другой цепи – $S_l|S_u$) представляет собой целевой ампликон, который появляется, таким образом, только в третьем цикле ПЦР. Для простоты целевой ампликон будем обозначать ниже как $S|S$; для указания иных ПЦР-продуктов также будут использоваться упрощенные обозначения в тех случаях, когда не будет требоваться конкретизация,

результатом синтеза с каких матричных цепей являются данные продукты.

Образование продуктов ПЦР, отличных по структуре от целевого ампликона, другими авторами не отмечается, хотя такие продукты синтезируются, и в отдельных случаях их нужно принимать во внимание.

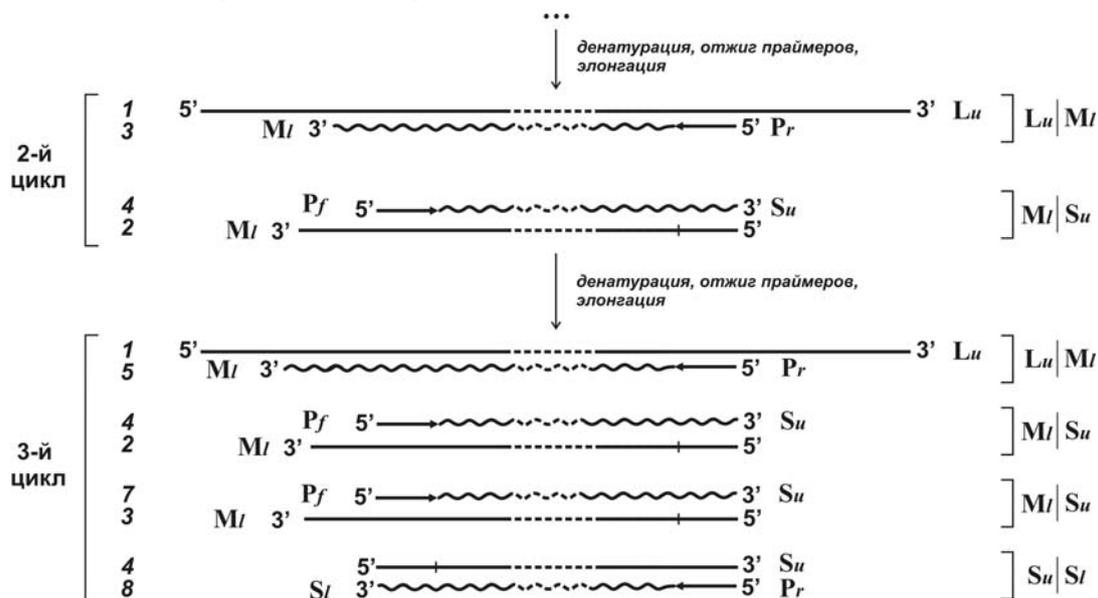


Рис. 3. Структура потомков цепи L_u , образующихся на втором и третьем циклах ПЦР. Обозначения: S_u (*upper Short*) – короткий ампликон целевого размера, образующийся в результате элонгации P_f на цепи M_l ; S_l (*lower Short*) – короткий ампликон целевого размера, образующийся в результате элонгации P_r на цепи S_u (остальные пояснения в тексте).

Fig. 3. Structure of L_u chain descendants formed in the second and third PCR cycles. Designations: S_u (*upper Short*) – a short amplicon of the target size formed as a result elongation of P_f on the M_l chain; S_l (*lower Short*) is a short amplicon of the target size formed as a result of elongation of P_r on the S_u chain (other explanations in the text).

Соотношение количеств разных типов основных ампликонов в ПЦР

Спустя 10 лет после разработки ПЦР было опубликовано письмо редактору, написанное сотрудниками лаборатории математической биологии Национального института рака (США) [Dimitrov, Apostolova, 1996], в котором они отметили, что, несмотря на многочисленные публикации, остается открытым вопрос относительно количества различных типов молекул, продуцируемых в ходе ПЦР. Они предложили свой подход к их подсчету, приняв, что в ПЦР образуется три типа молекул, обозначенных ими как IDNA (long, соответствует $L_u|M_l$, и $L_l|M_u$ согласно нашему обозначению), mDNA (medium, соответствует $M_l|S_u$ и $M_u|S_l$) и sDNA (short, соответствует $S_u|S_l$ и $S_l|S_u$). IDNA представляет собой продукты удлинения праймеров, отжигшихся на исходных цепях ДНК, mDNA – продукты удлинения тех же праймеров, отжигшихся на цепях, производных

от исходных цепей, а sDNA – это целевые ампликоны. Для подсчета количества целевых ампликонов Dimitrov и Apostolova предложили, не принимая во внимание, что эффективность размножения цепей ДНК никогда не достигает 100%, использовать следующую формулу:

$$N_{sDNA} = N_{total} - N_{IDNA} = 2^n - 2 - 2(n - 1) = 2^n - 2n.$$

Поскольку уже после 11 цикла IDNA и mDNA в сумме составляют около 1% от общего количества молекул ДНК (N_{total}) и далее эта доля еще больше снижается (табл. 1), они отметили, что таким количеством можно пренебречь, а для подсчета количества ампликонов следует использовать формулу $N_n = N_0 \times 2^n$, где N_0 - исходное количество амплифицируемых молекул (мишеней), 2 - максимальный коэффициент размножения молекул ДНК при ПЦР, n - число циклов ПЦР, N_n - количество ампликонов после n-ного цикла ПЦР.

Таблица 1

Максимально возможное количество разных типов молекул ДНК-матриц, образующихся к концу каждого цикла ПЦР при амплификации единичной исходной копии мишени.

Table 1 - The maximum number of different types of DNA molecules (amplicons) formed by the end of each PCR cycle during the amplification of a single copy of the initial target.

Циклы Cycles	Количество молекул ДНК-матриц (цепей, всего) Number of DNA templates (chains, total)	Количество молекул ДНК (цепей) разных типов The number of DNA molecules (chains) of different types			
		$L_u L_l$	$L_u M_l + L_l M_u$	M S	S S
0	2	2	-	-	-
1	2	0	2	-	-
2	4	0	2	2	-
3	8	0	2	4	2
4	16	0	2	6	8
5	32	0	2	8	22
6	64	0	2	10	52
7	128	0	2	12	114
8	256	0	2	14	240
9	512	0	2	16	494
10	1024	0	2	18	1004
11	2048	0	2	20	2026
(...)					
20	1048576	0	2	38	1048536
25	33554432	0	2	48	33554382
30	1073741824	0	2	58	1073741764

Однако на практике двукратного увеличения количества ДНК-цепей в каждом цикле не происходит⁶, поэтому накопление ПЦР-продуктов более точно описывается уравнением $N_n = N_0 \times (1+k)^n$, где $1+k$ – реальный коэффициент размножения цепей ДНК (k меняется от 0 до 1). $k=0$ соответствует ситуации, когда ни одна молекула ДНК не реплицировалась, $k=1$ в случаях, когда все молекулы ДНК удваиваются. Для $k=0,95$ после 25 циклов можно ждать увеличения исходного количества мишени в 17,8 миллиона раз вместо теоретически возможных 33,5 миллиона раз (2^{25}). При $k=0,7$ это значение составит примерно 600000 раз.

Как можно видеть из табл. 1, целевые ампликоны S|S появляются только после третьего цикла ПЦР (2 копии из расчета на каждую копию исходной ДНК). Далее их становится 4, затем 8, 22, 52 и т.д., т.е. приращение их количества, начиная с четвертого цикла, становится более чем двукратным. Однако прирост постепенно снижается и становится равным двукратному примерно после 15-го цикла (при условии 100%-го удвоения цепей). К 20-му

циклу ампликоны S|S будут составлять более 99,996% от всей ДНК, несущей амплифицируемую мишень.

При анализе продуктов ПЦР с помощью гель-электрофореза полоса ДНК после окрашивания геля бромистым этидием визуализируется при условии присутствия в ней около $10^{10} - 10^{12}$ молекул ампликона. Т.о., 10^4 копий исходной мишени⁷ при $k=0,95$ превратятся в $1,78 \times 10^{11}$ молекул целевого ампликона, что можно детектировать с помощью гель-электрофореза. При этом количество продуктов $M_l|S_u$ и $M_u|S_l$ будет равным примерно 10^5 , что недостаточно для подобной визуализации⁸. Стоит отметить, что $M_l|S_u$ и $M_u|S_l$ вместе с молекулами исходной ДНК могут выявляться в геле в стартовой зоне при условии их достаточно высокого содержания. При $k=0,7$ исходная мишень в количестве 10^4 копий приведет к 25 циклу к образованию 6×10^9 молекул ампликонов, что не позволит их детектировать гель-электрофорезом. В

⁷ количество в 10^4 копий мишени взято здесь не случайно, оно соответствует обычно берущемуся в ПЦР количеству ДНК (при условии достаточности ДНК-препарата)

⁸ продукты $M_l|S_u$ и $M_u|S_l$ не смогут сформировать единую полосу ДНК в геле, поскольку гетерогенны по размеру.

⁶ с каждым последующим циклом ПЦР эффективность размножения молекул ДНК снижается, что обуславливает выход реакции на плато

этом случае количество ПЦР-циклов нужно увеличить до 30-35, чтобы обеспечить повышение выхода ампликонов еще на два порядка.

Побочные типы продуктов ПЦР

Образование на стадии отжига бинарных ДНК-комплексов не ограничивается только указанными на рис. 3 вариантами формирования

одно/двухцепочечных структур, а носит более сложный характер. Приведенные на рис. 4 варианты отжига как непосредственно праймеров, так и полупродуктов ПЦР, а также самого целевого ампликона демонстрируют все возможные типы удлиняемых дуплексов, возникающих в ходе амплификации.

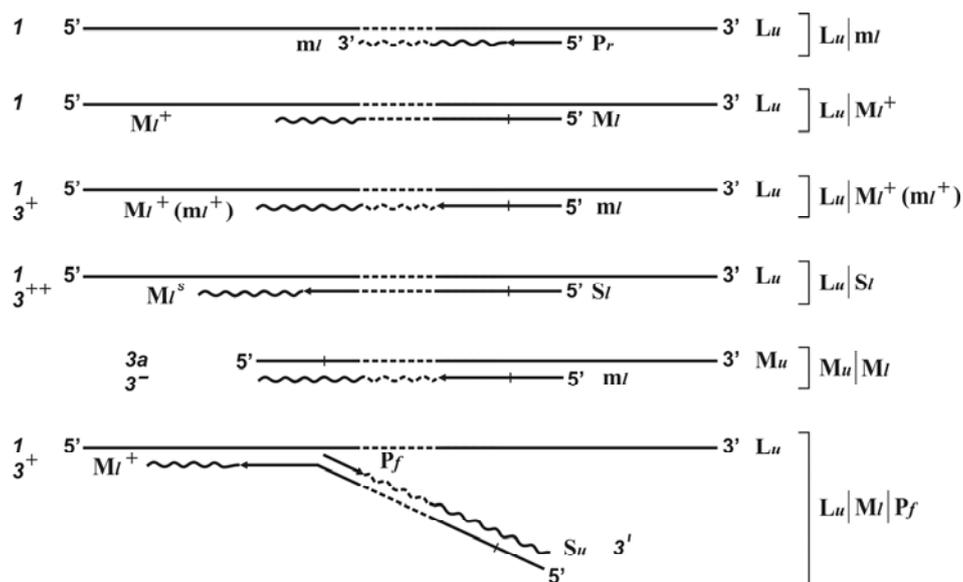


Рис. 4. Прочие типы ПЦР-ампликонов (пояснения в тексте).
Fig. 4. Other types of PCR amplicons (explanations are in the text).

Так, теоретически может происходить восстановление исходной молекулы ДНК, исключая тем самым отжиг праймеров. Вероятность этого события, безусловно, крайне низка, но для части молекул растет с увеличением количества копий исходной ДНК. Другими событиями являются отжиг и элонгация праймеров с образованием гетерогенных по длине продуктов, среди которых могут быть как те, что приведут к построению цепи дальше места отжига противоположного праймера - $L_u|M_l$ и $L_l|M_u$, так и не дошедшие до этого места - $L_u|m_l$ и $L_l|m_u$. (обозначение строчной буквой "m" символизирует их укороченный размер, не включающий зону отжига противоположного праймера⁹). Помимо событий, описанных выше для первого цикла, во втором цикле после денатурации цепей ДНК и этапа отжига произойдут также следующие. Так, на появившейся в первом цикле цепи M_l отожжется праймер P_f , в результате элонгации которого возникнут одно/двухцепочечные молекулы ДНК $M_l|S_u$. На исходной цепи ДНК L_u произойдет отжиг как праймера P_r , так и новообразованных цепей

m_l и M_l . Результатами удлинения праймера и короткой цепи m будут уже упоминавшиеся одно/двухцепочечные фрагменты ДНК $M_l|S_u$. Элонгация отжегшейся цепи M_l (по крайней мере, ее 3'-конца) приведет к формированию более длинного фрагмента ДНК, обозначенного нами как M_l^+ . Длина этого фрагмента будет также произвольна и зависима от продолжительности элонгации, скорости полимеризации, а также размера исходных фрагментов ДНК. В третьем и последующих циклах ПЦР, помимо появления/размножения целевых ампликонов $S|S$, возникающих за счет отжига и элонгации праймеров P_r и P_f на цепях S_u и S_l соответственно, может происходить удлинение цепей M_l , M_l^+ , M_u и M_u^+ . Изображение на их 3'-концах стрелок символизирует их роль в качестве затравок (удлиненных праймеров) для дальнейшей элонгации этих цепей ДНК.

Цепи ампликона $S|S$ также способны служить праймерами, и после их отжига на исходной ДНК это приведет к образованию продуктов типа $L|M$, обозначенных на рис. 4 как $L_u|M_l^s$ с целью отличить их от подобных ПЦР продуктов, возникающих при удлинении праймера. Здесь стоит отметить, что наиболее часто используемая в ПЦР полимеразы Taq способна присоединять к 3'-концам цепей

⁹ как и на рис. 3, на рис. 4 для простоты изображены потомки только одной из двух исходных цепей ДНК

дополнительный нематричный нуклеотид, преимущественно dA [Clark, 1988]. Для того, чтобы цепи ампликонов с dA на 3'-концах служили затравками, необходимо наличие комплементарного матричного нуклеотида в положении -1 от 5'-конца сайта отжига праймера. В случае использования фермента, обладающего 3'→5'-экзонуклеазной редактирующей активностью (например, полимеразы *Pfu*) или не обладающего терминальной нуклеотидилтрансферазной активностью, целевые ампликоны не будут нести дополнительного нематричного нуклеотида и, следовательно, их 3'-концы становятся полностью комплементарными матричной ДНК и готовыми к элонгации.

Еще одним возможным типом ДНК-структур, образующихся в результате отжига, например, на исходной цепи L_u 3'-концевой части фрагмента M_i и в

свою очередь на неспаренной части последнего - праймера P_f , может стать сложная структура $L_u|M_i|S_u$. Аналогичная ситуация будет наблюдаться с потомками другой (нижней) цепи ДНК L_l .

Еще три типа ДНК-структур, появляющиеся на стадии отжига или при переходе от денатурации к отжигу, неспособны к элонгации ввиду отсутствия для них матричной последовательности – M|M, S|M и S|S (рис. 5). Они снижают эффективность размножения цепей ДНК, поскольку исключаются из процесса отжига праймеров. При амплификации в реальном времени с помощью интеркалирующих красителей такие структуры будут давать вклад в общее свечение образца, но не обеспечивая его прирост. В последующих циклах все вышеописанные события также будут происходить, но с разной эффективностью.

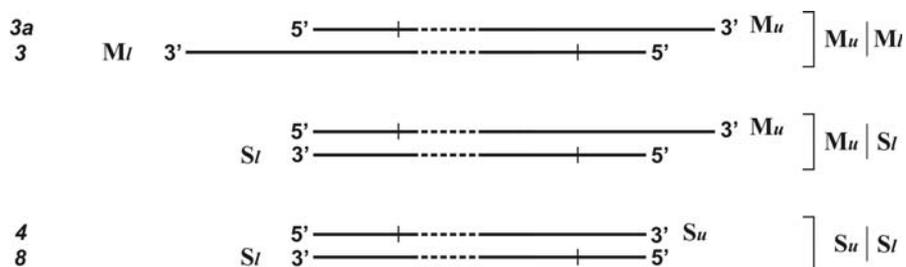


Рис. 5. Реассоциация цепей ампликонов с образованием двуцепочечных структур, не приводящих к синтезу новых цепей ДНК
 Fig. 5. Reassociation of amplicons with the formation of double-stranded DNA structures, which does not lead to the synthesis of new DNA strands

Помимо указанных на рис. 5 молекул ДНК, могут образовываться и другие вторичные структуры за счет отжигающихся друг на друга цепей ДНК разных типов: S|S|P, S|S|P|P, M|M|P, M|M|P|P, M|S|P и т.д. (на рис. 6 приведен только один пример). В случае использования ДНК-полимераз с 5'→3'-экзонуклеазной, flap-эндонуклеазной и/или цепь-вытесняющей активностями подобные структуры могут приводить к образованию продуктов

расщепления разной длины. Что касается наиболее используемой ДНК-полимеразы *Taq*, то она в подобных бифуркационных структурах Y-типа способна проявлять flap-эндонуклеазную активность, расщепляя цепи ампликона вблизи 3'-конца отжигшегося праймера с образованием фрагмента ДНК с новым 3'-концом, который также, как и праймер, способен служить затравкой при амплификации [Lyamichev et al., 1993; 1999].

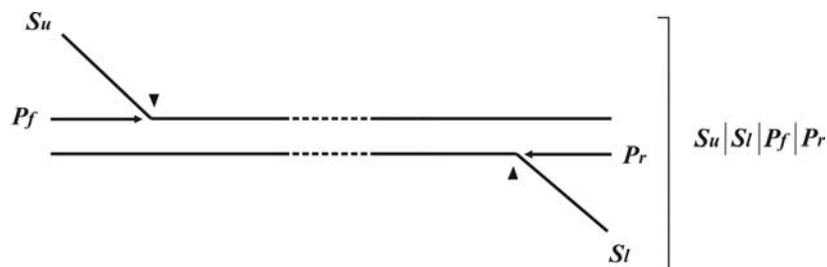


Рис. 6. Бифуркационные структуры Y-типа (показано на примере S|S|P|P), образующиеся за счет "дыхания" цепей ДНК и одновременного отжига праймеров на цепях ампликона. Места расщепления цепей ДНК полимеразой *Taq* за счет ее flap-эндонуклеазной активности показаны треугольниками.
 Fig. 6. Y-type bifurcation structures (S|S|P|P is shown as an example), formed due to "DNA breathing" and simultaneous annealing of primers on the amplicon chains. The sites cleaved by *Taq* polymerase due to its flap endonuclease activity are shown by triangles.

Причины выхода ПЦР на плато

Для понимания причин торможения ПЦР следует рассмотреть протекание молекулярных процессов в реакционной смеси. Для удобства примем объем смеси равным 10 мкл, распределение молекул равномерным. Объем 10 мкл можно представить как 10^{16} зептолитров (1 зептолитр – это 1000 нм^3 , равен 10^{-21} л). Один зептолитр, который можно считать условной реакционной ячейкой, соответствует области пространства размером $10 \times 10 \times 10 \text{ нм}$, однако с учетом геометрии биологических макромолекул форму такой ячейки можно задать как параллелепипед с размерами сторон $4 \times 5 \times 50 \text{ нм}$. Если допустить, что стартовое количество копий мишени, представленное в виде геномной ДНК размером 1 млрд.п.н., составляет 10^4 и предстоит амплифицировать фрагмент ДНК длиной 1000 п.н., в пробирке будет находиться еще "балластная" ДНК в количестве 10^6 условных фрагментов длиной по 1000 п.н. каждый на одну копию. Указанные размеры молекул ДНК приведены для удобства расчета: цепь длиной 1000 п.н. способна разместиться в объеме 1 зептолитр (1000 нм^3). Итого в 10 мкл реакционной смеси будут находиться около 10^{10} различных фрагментов (участков) ДНК, кратных тысяче нуклеотидов, распределенных по 10^{16} зл (10 мкл) таким образом, что только 10^4 зептолитровых ячеек будут нести мишень - амплифицируемую ДНК.

Прямой и обратный праймеры берутся в количестве примерно 10^{12} на образец, занимая, таким образом, 2×10^{12} зептолитровых ячеек. Каждый из четырех дНТФ присутствует на старте ПЦР в количестве 10^{15} молекул на 10 мкл жидкости, и приблизительно каждая пятая ячейка при максимально равномерном распределении будет содержать хоть какой-нибудь дНТФ. Каждая десятая условная зептолитровая ячейка будет содержать MgCl_2 , которых также берется 10^{15} молекул. Что касается ДНК-полимеразы, то молекул фермента в реакционной смеси присутствует обычно около 10^{10} ; таким образом, ДНК полимеразы будет находиться только примерно в одной миллионной части ячеек. Необходимо принимать во внимание, что возможно неравномерное распределение ингредиентов.

Таким образом, на 10^{16} зептолитровых ячеек будет приходится по 10^{15} молекул MgCl_2 , 10^{15} дНТФ, 10^{12} праймеров, 10^{10} ДНК-полимеразы. И только 10^4 зептолитровых ячеек будут содержать мишень, которая за 25 циклов реакции должна размножиться примерно в 10^7 раз и распределиться в 10^{11} зептолитровых ячейках. Следовательно, в некоторых ячейках будут присутствовать не все необходимые ингредиенты, и тогда в них амплификация не произойдет. Но благодаря циклическому изменению температуры в реакционном объеме неизбежно возникают конвективные ячейки (Бенара-Релея либо

Марангони¹⁰), поэтому содержимое ячеек постоянно перемешивается, обеспечивая сближение молекул¹¹. За счет этого две разошедшиеся во время денатурации комплементарные цепи любых молекул ДНК окажутся далеко друг от друга, что снизит вероятность восстановления исходной двухцепочечной структуры. Однако эта вероятность повысится при увеличении количества копий мишени, например, при амплификации высококопийных последовательностей. Так, работая с высокоповторенными генами рибосомной РНК пшениц (представленными в геноме тысячу и более копий) и при изучении так называемого межгенного спейсера, разделяющего тандемные повторы рДНК и включающего в свой состав до десятка и более специфических субповторов, нам приходилось резко уменьшать стартовое количество ДНК для достижения оптимальных результатов амплификации. В противном случае при использовании стандартного количества стартовой ДНК (около 10^4 копий генома), количество последовательностей мишени для субповторов рДНК приближалось бы к 10^9 . Это, в свою очередь, приводило бы к ситуации, когда на первых ПЦР-циклах в синтезировалось бы большое количество продуктов M_n и M_p , и как следствие увеличивалась бы вероятность образования нецелевых ампликонов на их основе, ускоряя выход реакции на плато.

Еще в 1991 г. К.Мюллис в одной из своих статей [Mullis, 1991] рекомендовал использовать при рассмотрении ПЦР на молекулярном уровне абсолютные количества молекул ингредиентов. В некоторых случаях, например, при расчетах вероятности того или иного амплификационного события, действительно необходимо знать количество взаимодействующих молекул. В таблице 2 приведены значения концентраций и соответствующие им количества молекул различных ингредиентов ПЦР.

В целом ряде работ в качестве одной из главных причин замедления ПЦР и выхода этой реакции на плато указывается истощение (снижение концентрации) отдельных ингредиентов, среди которых чаще всего упоминаются праймеры и дНТФ. Но как можно видеть из табл. 2, этого не происходит: изменением их количества можно пренебречь, хотя при проведении ПЦР-амплификации единичных копий мишени количество праймеров может заметно уменьшиться.

¹⁰ И для этого даже не нужно организации так называемой конвекционной ПЦР, представляющей собой отдельную разновидность этой реакции [Чемерис и др. (Chemeris et al.), 2021; Garafutdinov et al., 2022a].

¹¹ сближение молекул обеспечивается также за счет диффузии.

Таблица 2.

Примерное количество молекул, расходующихся или образующихся за 25 циклов ПЦР при амплификации условных мишеней длиной 100 и 1000 п.н. в ДНК размером около 1 млрд.п.н. в 10 мкл реакционной смеси (указаны порядки соответствующих величин)

Ингредиенты	Общее количество до начала ПЦР	Общее количество молекул до начала ПЦР	Общее количество молекул после окончания ПЦР (100 п.н.)	Общее количество молекул после окончания ПЦР (1000 п.н.)
Исходная ДНК* $L_u L_l$	20 нг	10^4 копий	10^4 (в виде пар цепей ДНК)	10^4 (в виде пар цепей ДНК)
Ампликоны $L_u M_l + L_l M_u$	-	0	10^4	10^4
Ампликоны M S	-	0	10^5	10^5
Целевые ампликоны S S	-	0	10^{11}	10^{11}
Все ампликоны	-	0	$10^4 + 10^5 + 10^{11} \approx 10^{11}$	$10^4 + 10^5 + 10^{11} \approx 10^{11}$
Праймеры	10 пкмоль	10^{12}	$10^{12} - 10^7 \approx 10^{12}$	$10^{12} - 10^7 \approx 10^{12}$
ДНК-полимераза**	1 ед. акт.	10^{10}	$10^{10}***$	$10^{10}***$
дНТФ	2 нмоль	10^{15}	$10^{15} - 10^9 \approx 10^{15}$	$10^{15} - 10^{10} \approx 10^{15}$
Пирофосфат	-	0	10^9	10^{10}
H^+ (протон)	- ****	0	10^9	10^{10}
$MgCl_2$	3 мМ	10^{15}	$10^{15} - 10^{10} \approx 10^{15}$	$10^{15} - 10^{11} \approx 10^{15}$
H_2O	10 мкл	10^{20}	$10^{21} - 10^{10} \approx 10^{21}$	$10^{21} - 10^{11} \approx 10^{21}$

* под исходной ДНК здесь понимается условная геномная ДНК с нуклеотидной последовательностью длиной 1 млрд.п.н., несущая 1 копию последовательности мишени.

** фермент добавляется в реакционную смесь с учетом «единиц активности». Следует понимать, что не все молекулы фермента в исходном реактиве способны катализировать реакцию.

*** считается, что к 30 циклу ПЦР остается ~2/3 каталитически активных молекул фермента.

**** имеются в виду только те протоны, которые высвобождаются при синтезе ДНК.

Table 2. Approximate number of molecules consumed or formed for 100 and 1000 bp amplification targets from 1 billion bp genomic DNA during 25 PCR cycles (orders of corresponding quantities are indicated)

Ingredients	Number (concentration) before PCR	Absolute numbers (in molecules/ions) before PCR	Absolute quantities (in molecules/ions) after the end of PCR (100 bp)	Absolute quantities (in molecules/ions) after the end of PCR (1000 bp)
The original DNA* $L_u L_l$	20 ng	10^4 (genome copy)	10^4 (as pairs of DNA chains)	10^4 (as pairs of DNA chains)
Amplicons $L_u M_l + L_l M_u$	-	0	10^4	10^4
Amplicons M S	-	0	10^5	10^5
Target amplicon S S	-	0	10^{11}	10^{11}
All amplicons	-	0	$10^4 + 10^5 + 10^{11} \approx 10^{11}$	$10^4 + 10^5 + 10^{11} \approx 10^{11}$
Primers	1 μ M	10^{12}	$10^{12} - 10^7 \approx 10^{12}$	$10^{12} - 10^7 \approx 10^{12}$
DNA polymerase**	1 ед. акт.	10^{10}	$10^{10}***$	$10^{10}***$
dNTP	200 μ M	10^{15}	$10^{15} - 10^9 \approx 10^{15}$	$10^{15} - 10^{10} \approx 10^{15}$
Pyrophosphate	-	0	10^9	10^{10}
H^+ (proton)	- ****	0	10^9	10^{10}
$MgCl_2$	3 mM	10^{15}	$10^{15} - 10^{10} \approx 10^{15}$	$10^{15} - 10^{11} \approx 10^{15}$
H_2O	10 μ l	10^{21}	$10^{21} - 10^{10} \approx 10^{21}$	$10^{21} - 10^{11} \approx 10^{21}$

* here, the original DNA refers to some genomic DNA with 1 billion bp nucleotide sequence, carrying 1 copy of the target sequence.

** the enzyme is added to the reaction mixture, taking into account the “units of activity”. It should be understood that not all enzyme molecules in the starting reagent are capable of catalyzing the reaction.

*** It is believed that by the 30th PCR cycle, ~2/3 of the catalytically active enzyme molecules remain.

**** refers only to those protons that are released during DNA synthesis.

Часто не принимается во внимание, что не все молекулы ДНК-полимеразы сохраняют свою активность по мере протекания ПЦР. Однако есть свидетельства того, что после каждого цикла ферментативная активность многих полимераз уменьшается в среднем на 1%. Это означает, что 10^8 "активных" молекул ДНК-полимеразы (из исходных 10^{10} молекул) становятся неспособными к дальнейшему осуществлению полимеризации. Таким образом, к 30 циклу фермент сохранит ~2/3 исходной активности. Можно допустить, что молекулы полимеразы, принявшие участие в построении цепи, успевают построить еще одну или несколько новых цепей ДНК, однако тут важно учесть процессивность используемого фермента и размер целевого ампликона. Во многих работах подчеркивается, что использование увеличенного количества ДНК-полимераз заметно влияет на время выхода реакции на плато, но данному вопросу здесь уделять внимания не будем.

Для понимания особенностей репликации ДНК в ходе ПЦР необходимо также учитывать, что при повышенной температуре с некоторой частотой происходит отщепление азотистых оснований (преимущественно аденина), что приводит к появлению апуриновых сайтов, которые многие ДНК-полимеразы не могут преодолеть. Следствием апуринизации является также нарушение целостности (фрагментация) цепей ДНК. Так, показано, что ампликон длиной 1078 п.н., выдержанный после ПЦР при 94°C в течение более 60 минут, разрушался настолько, что переставал быть виден в геле как цельная полоса, тогда как после 30 минут такой инкубации следы данной полосы еще угадывались [Douglas, Atchinson, 1993]. Учитывая, что грань между уверенно детектируемым с помощью гель-электрофореза числом молекул ДНК и недетектируемым их количеством составляет 2-3 порядка (10^{10-12} и 10^{8-10} соответственно), в описываемом случае должно было произойти разрушение около 30-40% ампликонов. Другими авторами показано, что появление под действием высокой температуры производных пуринов приводит к замедлению полимеризации ДНК-цепей под действием полимеразы Taq и, как следствие, к снижению эффективности ПЦР, что способствует выходу реакции на плато [Sikorsky et al., 2004; 2007].

Во многих статьях, посвященных математической теории ПЦР, авторами для упрощения принимается, что все дНТФ одинаково реакционноспособны при включении в синтезирующиеся ДНК-цепи, однако имеются данные, что это не так [Doronin et al., 1989]. Кроме того, при повышенной температуре происходит частичная модификация азотистых оснований

(дезаминирование). Так, дЦТФ подвергается дезаминированию и превращается в дУТФ, который некоторыми ДНК-полимеразами способен включаться в растущую цепь ДНК¹², но с меньшими эффективностью и скоростью. Однако большинство ДНК-полимераз не может использовать данный субстрат, при этом он вызывает сильное ингибирование фермента уже в низких концентрациях. Показано, что присутствие 0,01% дУТФ в реакционной смеси заметно ингибирует *Pfu* полимеразу, а добавление термостабильной дУТФ-пирофосфатазы повышает выход продуктов в ПЦР [Hogrefe et al., 2002]. Позже сходные результаты были получены и другими авторами для других ферментов [Dabrowski, Kiaer Ahring, 2003; Cho et al., 2007]. Дезаминированию, хотя и с меньшей скоростью, подвергаются также дАТФ и дГТФ с образованием соединений, не способных выступать в качестве субстратов большинства ДНК-полимераз.

Еще одним ингредиентом ПЦР-смеси является пирофосфат, высвобождающийся при присоединении дНМФ к растущей цепи ДНК. В начале ПЦР пирофосфат в реакционной смеси отсутствует, но в ходе ПЦР он накапливается экспоненциально. После 25 цикла его количество, хотя и не превышает 1% от оставшихся дНТФ, становится заметным, и молекулы пирофосфата начинают конкурировать с дНТФ за образование четвертичного комплекса. В результате усиливается пирофосфоролиз, заключающийся не в удлинении синтезируемой цепи, а наоборот, в ее укорочении на один нуклеотид, что приводит к задержке накопления продуктов ПЦР. Таким образом, этот процесс также способствует выходу реакции на плато. Подтверждением может служить работа корейских авторов, показавших, что добавление в ПЦР-смесь термостабильной пирофосфатазы, разрушающей пирофосфат до неорганического фосфата, повышало выход ампликонов [Park et al., 2010]. В другой работе приводятся сведения о том, что пирофосфат не вносит вклада в затухание ПЦР [Morrison, Gannon, 1994]. Такой вывод был сделан авторами на основании модельного эксперимента, в котором в реакционную смесь был изначально добавлен пирофосфат в концентрации, равной той, что получается при завершении ПЦР. Однако при внимательном рассмотрении приведенной авторами фотографии гель-электрофореза можно увидеть снижение количества ампликона с ростом концентрации пирофосфата. Необходимо также учитывать, что

¹² приводя к изменениям нуклеотидной последовательности со всеми вытекающими из этого обстоятельствами: снижению эффективности отжига или невозможности элонгации праймеров.

некоторая часть пирофосфата связывается с присутствующими в растворе ионами магния с образованием плохо растворимого в воде $Mg_2P_2O_7$, увеличивающего мутность раствора, на чем основан один из вариантов детекции результатов LAMP-амплификации [Mori et al., 2004; Гарафутдинов и др. (Garafutdinov et al.), 2021].

При присоединении дНМФ к растущей цепи ДНК высвобождаются также протоны. Наличие буферных солей предотвращает значительное изменение pH раствора, поэтому их влияние на активность ДНК-полимеразы минимизировано. Следует иметь в виду, что обычно используемый в ПЦР буфер, содержащий 10-20 mM трис-HCl (pH 8.3 при 20°C), характеризуется заметным температурным сдвигом рК: этот показатель снижается на 0.021 единиц с увеличением температуры на каждый градус. Это приводит к тому, что данный буфер будет иметь значения рК от 7.7 на этапе отжига праймеров до 6.7 на этапе денатурации. При этом ДНК-полимераза, как известно, способна вести полимеризацию при разных температурах и, следовательно, при отличающихся значениях pH.

Как уже отмечалось выше, на стадиях отжига и элонгации образуются различные комплексы с участием различных молекул ДНК, праймеров, ДНК-полимеразы и дНТФ. Каждое из этих событий носит вероятностный характер, зависящий от ряда факторов. Так, для отжига праймеров одним из главных условий является температура. При этом, по-видимому, при достижении некоторой температуры возможно нахождение комплекса "праймер – матрица" в состоянии динамического равновесия (диссоциация-реассоциация, известное как «дыхание цепей»)¹³, причем для начала элонгации достаточно и неполного связывания всей последовательности праймера с матрицей, а лишь его 3'-концевой части. Этим в том числе объясняется образование ампликонов, не соответствующих ожидаемым, возникающим в результате ложного отжига праймера. Для исключения такой возможности рекомендуется использовать так называемый «горячий старт», вариантов которого довольно много [Чемерис и др. (Chemeris et al.), 2012].

Праймеры присутствуют в реакционной смеси в весьма высоких концентрациях, позволяющих им во время отжига найти комплементарные себе участки на матрице и сформировать с ними комплексы типа L|P. Вероятность формирования затравочных комплексов типов L|M, L|S, L|m, казалось бы, значительно ниже по сравнению с

праймерными комплексами. Однако следует принимать во внимание то обстоятельство, что переход к температуре отжига праймеров происходит от более высокой температуры денатурации и проходит интервал температур, при которых более протяженные фрагменты M, S и m¹⁴ уже способны формировать комплексы, а праймеры P – еще нет. Из перечисленных выше молекул M, m и S, последняя, являясь целевым ампликоном, в поздних циклах ПЦР представлена уже довольно значительным числом копий, достигающим 10¹⁰-10¹¹, и вполне способна конкурировать с праймерами за места отжига на матрицах L и M. К тому же преимущественное образование при понижении температуры структур S|S также уменьшает эффективность размножения молекул ДНК и способствует выходу реакции на плато. «Медленные» ДНК-термоциклы (с невысокой скоростью смены температур) потенциально могут приводить к большему числу неспецифических продуктов и к более быстрому завершению реакции. Причем у таких приборов, к сожалению, скорость охлаждения, как правило, заметно уступает скорости нагрева. Здесь можно лишь заметить, что при ускоренном нагреве сокращается продолжительность ПЦР и заодно время пребывания ДНК-полимеразы при повышенной температур, что важно с точки зрения сохранения активности фермента.

Исходя из вышеизложенного, можно прийти к заключению, что заметного истощения дНТФ (если не считать дезаминирования дЦТФ), праймеров и прочих ингредиентов в ходе ПЦР к моменту выхода реакции на плато не происходит, и их вклад в ее затухание, по-видимому, ничтожно мал. Заметим, что для ампликации, в которой предполагается достичь увеличения количества ДНК-мишени в 10¹⁰-10¹¹ раз, нужно брать большее количество праймеров. Однако, хотя увеличенное количество праймеров и способствует продлению ПЦР, но из-за вероятности их отжига вне целевых участков последовательности ДНК и образования гомо- и гетеродимеров это приведет к ускорению и неспецифической ампликации. Таким образом, главной причиной затухания ПЦР следует считать повышение концентрации всех синтезированных в ходе реакции ДНК-продуктов, обуславливающее конкуренцию между ними и праймерами за места отжига.

Заключение

В ходе ПЦР помимо целевых ампликонов образуется еще целый ряд других продуктов, часть которых можно считать частично целевыми, а

¹³ на этом эффекте основана так называемая квазиизотермическая ПЦР (Гарафутдинов и др., неопубликованные данные)

¹⁴ перечислены здесь в порядке уменьшения их размеров

остальные являются неспецифическими ампликонами. В большинстве случаев таковые можно игнорировать, однако об их присутствии в реакционной смеси нужно знать, особенно когда ПЦР проводится не только в диагностических целях, а предполагается проведение дальнейших манипуляций, в том числе на уровне отдельных молекул.

Учитывая множественность факторов, оказывающих влияние на ПЦР, может сложиться впечатление, что данная реакция не должна протекать. Тем не менее, ПЦР легко осуществима при соблюдении необходимых требований: верном выборе оптимальной мишени (нужно учитывать контекстно-зависимые свойства нуклеиновых кислот), подборе "качественных" праймеров (например, исключение димеризации праймеров), использовании подходящей полимеразы (выбор должен соответствовать решаемым задачам), использовании оптимальных концентраций ингредиентов и температурного режима, и ряда других. Однако если даже при соблюдении указанных условий (включая использование ПЦР-энхансеров) ПЦР все же не протекает, то приходится менять систему праймеров или мишень, когда это позволяет стоящая задача.

Выход ПЦР на плато является неизбежным, и главная задача экспериментаторов – обеспечить снижение наработки нецелевых ампликонов в пользу образования большего количества целевых.

Литература

1. Гарафутдинов Р.Р., Баймиев Ан.Х., Малеев Г.В., Алексеев Я.И., Зубов В.В., Чемерис Д.А., Кирьянова О.Ю., Губайдуллин И.М., Матниязов Р.Т., Сахабутдинова А.Р., Никоноров Ю.М., Кулуев Б.Р., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. Разнообразие праймеров для ПЦР и принципы их подбора. *Биомика*. 2019. Т.11(1). С. 23 – 70. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2019-04
2. Гарафутдинов Р.Р., Чемерис Д.А., Мавзютов А.Р., Ахметзянова Л.У., Давлеткулов Т.М., Губайдуллин И.М., Чемерис А.В. Петлевая LAMP амплификация нуклеиновых кислот. I. Два десятилетия развития и совершенствования // *Biomics*. 2021. Т.13(2). С. 176-226. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2021-14
3. Сахабутдинова А.Р., Чемерис Д.А., Чемерис А.В., Гарафутдинов Р.Р. Энхансеры ПЦР. I. Общие сведения // *Biomics*. 2023. Т.15(3). С.218-223. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2023-20
4. 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.
5. Чемерис Д.А., Гарафутдинов Р.Р., Сахабутдинова А.Р., Малеев Г.В., Чемерис А.В. Конвекционная ПЦР в конвективных ячейках разных типов. *Биомика*. 2018. Т.10(4). С. 410-443. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-52
6. Чемерис Д.А., Кирьянова О.Ю., Губайдуллин И.М., Чемерис А.В. Дизайн праймеров для полимеразной цепной реакции (краткий обзор компьютерных программ и баз данных) // *Биомика*. 2016. Т. 8. № 3. С. 215-238.
7. Чемерис Д.А., Магданов Э.Г., Машков О.И., Гарафутдинов Р.Р., Чемерис А.В. ПЦР с отложенным (горячим или задержанным) стартом // *Биомика*. 2011. Т. 2. № 1. С. 1-8.
8. Cho Y, Lee HS, Kim YJ, Kang SG, Kim SJ, Lee JH. Characterization of a dUTPase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus onnurineus* NA1 and its application in polymerase chain reaction amplification // *Mar Biotechnol*. 2007. V.9(4). P.450-458. doi: 10.1007/s10126-007-9002-8
9. Clark JM. Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases // *Nucleic Acids Res*. 1988. V.16(20). P.9677-9686. doi: 10.1093/nar/16.20.9677
10. Dabrowski S, Kiaer Ahring B. Cloning, expression, and purification of the His6-tagged hyperthermostable dUTPase from *Pyrococcus woesei* in *Escherichia coli*: application in PCR // *Protein Expr Purif*. 2003. V.31(1). P.72-78. doi: 10.1016/s1046-5928(03)00108-6
11. Dimitrov DS, Apostolova MA. The limit of PCR amplification // *J Theor Biol*. 1996. V.178(4). P.425-426. doi: 10.1006/jtbi.1996.0041
12. 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. P. 83-85. doi: 10.1016/0014-5793(89)81500-5
13. Douglas A, Atchison B. Degradation of DNA during the denaturation step of PCR // *PCR Methods Appl*. 1993. V.3(2). P.133-134. doi: 10.1101/gr.3.2.133
14. Garafutdinov R.R., Chemeris D.A., Sakhabutdinova A.R., Kiryanova O.Y., Mikhaylenko C.I., Chemeris A.V. Encoding of non-biological information for its long-term storage in DNA // *Biosystems*. 2022. V.215-216. 104664. doi: 10.1016/j.biosystems.2022.104664
15. Garafutdinov R.R., Galimova A.A., Sakhabutdinova A.R. The influence of quality of primers on the formation of primer dimers in PCR // *Nucleos. Nucleot. Nucleic Acids*. 2020. V. 39(9). P. 1251-1269. doi: 10.1080/15257770.2020.1803354
16. Garafutdinov RR, Chemeris DA, Sakhabutdinova AR, Moiseev KV, Urmancheev SF, Mikhaylenko CI, Privalov LY, Chemeris AV. Convective

- polymerase chain reaction in standard microtubes // *Anal Biochem.* 2022a. V.641. 114565. doi: 10.1016/j.ab.2022.114565
17. Hogrefe HH, Hansen CJ, Scott BR, Nielson KB. Archaeal dUTPase enhances PCR amplifications with archaeal DNA polymerases by preventing dUTP incorporation // *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002. V.99(2). P.596-601. doi: 10.1073/pnas.012372799
18. Jansson L, Hedman J. Challenging the proposed causes of the PCR plateau phase // *Biomol Detect Quantif.* 2019. V.17. 100082. doi: 10.1016/j.bdq.2019.100082
19. Kainz P. The PCR plateau phase - towards an understanding of its limitations // *Biochim Biophys Acta.* 2000. V.1494(1-2). P.23-27. doi: 10.1016/s0167-4781(00)00200-1
20. Lyamichev V, Brow MA, Dahlberg JE. Structure-specific endonucleolytic cleavage of nucleic acids by eubacterial DNA polymerases // *Science.* 1993. V.260(5109). P.778-783. doi: 10.1126/science.7683443
21. Lyamichev V, Brow MA, Varvel VE, Dahlberg JE. Comparison of the 5' nuclease activities of taq DNA polymerase and its isolated nuclease domain // *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999. V.96(11). P.6143-6148. doi: 10.1073/pnas.96.11.6143
22. 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.145-157. doi: 10.1016/j.jbbm.2003.12.005
23. Morrison C, Gannon F. The impact of the PCR plateau phase on quantitative PCR // *Biochim Biophys Acta.* 1994. V.1219(2). P.493-498. doi: 10.1016/0167-4781(94)90076-0
24. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 1987. V.155. P.335-350. doi: 10.1016/0076-6879(87)55023-6
25. Mullis KB. The polymerase chain reaction in an anemic mode: how to avoid cold oligodeoxyribonuclear fusion // *PCR Methods Appl.* 1991. V.1(1). P.1-4. doi: 10.1101/gr.1.1.1
26. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia // *Science.* 1985. V.230(4732). P.1350-1354. doi: 10.1126/science.2999980
27. Sikorsky JA, Primerano DA, Fenger TW, Denvir J. DNA damage reduces Taq DNA polymerase fidelity and PCR amplification efficiency // *Biochem Biophys Res Commun.* 2007. V.355(2). P.431-437. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.01.169
28. Sikorsky JA, Primerano DA, Fenger TW, Denvir J. Effect of DNA damage on PCR amplification efficiency with the relative threshold cycle method // *Biochem Biophys Res Commun.* 2004. V.323(3). P.823-830. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.08.168
29. Spaete RR, Frenkel N. The herpes simplex virus amplicon: a new eucaryotic defective-virus cloning-amplifying vector // *Cell.* 1982. V.30(1). P.295-304. doi: 10.1016/0092-8674(82)90035-6

References

1. Chemeris A.V., Aminev F.G., Garafutdinov R.R., Anisimov V.A., Sagitov A.M., Khusnutdinova E.K., Sakhabutdinova A.R., Chemeris D.A., Mikhailenko K.I. DNA forensics. M.: Nauka, 2022. 466 p. (In Russian)
2. Chemeris D.A., Garafutdinov R.R., Sakhabutdinova A.R., Maleev G.V., Chemeris A.V. Convection PCR in different types of convective cells. *Biomics.* 2018. V. 10(4). P. 410-443. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-52 (In Russian)
3. Chemeris D.A., Kiryanova O.Yu., Gubaydullin I.M., Chemeris A.V. Design of primers for polymerase chain reaction (Brief review of software and databases). *Biomics.* 2016. V. 8(3). P.215-238. (In Russian)
4. Chemeris D.A., Magdanov E.G., Mashkov O.I., Garafutdinov R.R., Chemeris A.V. Hot start or time-release PCR. *Biomics.* 2011. V.2(1). P.1-8. (In Russian)
5. Cho Y, Lee HS, Kim YJ, Kang SG, Kim SJ, Lee JH. Characterization of a dUTPase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus onnurineus* NA1 and its application in polymerase chain reaction amplification. *Mar Biotechnol.* 2007. V.9(4). P.450-458. doi: 10.1007/s10126-007-9002-8
6. Clark JM. Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* 1988. V.16(20). P.9677-9686. doi: 10.1093/nar/16.20.9677
7. Dabrowski S, Kiaer Ahring B. Cloning, expression, and purification of the His6-tagged hyper-thermostable dUTPase from *Pyrococcus woesei* in *Escherichia coli*: application in PCR. *Protein Expr Purif.* 2003. V.31(1). P.72-78. doi: 10.1016/s1046-5928(03)00108-6
8. Dimitrov DS, Apostolova MA. The limit of PCR amplification. *J Theor Biol.* 1996. V.178(4). P.425-426. doi: 10.1006/jtbi.1996.0041
9. 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. P. 83-85. doi: 10.1016/0014-5793(89)81500-5
10. Douglas A, Atchison B. Degradation of DNA during the denaturation step of PCR. *PCR Methods Appl.* 1993. V.3(2). P.133-134. doi: 10.1101/gr.3.2.133
11. Garafutdinov R.R., Baymiev An.Kh., Maleev G.V., Alexeyev Ya.I., Zubov V.V., Chemeris D.A., Kiryanova J.Yu., Gubaydullin I.M., Matniyazov R.T., Sakhabutdinova A.R., Nikonorov Yu.M., Kuluev B.R.,

- Baymiev Al.Kh., Chemeris A.V. Diversity of PCR primers and principles of their design. *Biomics*. 2019. V.11(1). P. 23 – 70. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2019-04 (In Russian)
12. Garafutdinov R.R., Chemeris D.A., Mavzyutov A.R., Akhmetzyanova L.U., Davletkulov T.M., Gubaydullin I.M., Chemeris A.V. LAMP amplification of nucleic acids. I. Two decades of development and improvement. *Biomics*. 2021. V.13(2). P. 176-226. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2021-14 (In Russian)
13. Garafutdinov R.R., Chemeris D.A., Sakhabutdinova A.R., Kiryanova O.Y., Mikhaylenko C.I., Chemeris A.V. Encoding of non-biological information for its long-term storage in DNA. *Biosystems*. 2022. V.215-216. 104664. doi: 10.1016/j.biosystems.2022.104664
14. Garafutdinov R.R., Galimova A.A., Sakhabutdinova A.R. The influence of quality of primers on the formation of primer dimers in PCR. *Nucleos. Nucleot. Nucleic Acids*. 2020. V. 39(9). P. 1251-1269. doi: 10.1080/15257770.2020.1803354
15. Garafutdinov RR, Chemeris DA, Sakhabutdinova AR, Moiseev KV, Urmancheev SF, Mikhaylenko CI, Privalov LY, Chemeris AV. Convective polymerase chain reaction in standard microtubes. *Anal Biochem*. 2022a. V.641. 114565. doi: 10.1016/j.ab.2022.114565
16. Hogrefe HH, Hansen CJ, Scott BR, Nielson KB. Archaeal dUTPase enhances PCR amplifications with archaeal DNA polymerases by preventing dUTP incorporation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002. V.99(2). P.596-601. doi: 10.1073/pnas.012372799
17. Jansson L, Hedman J. Challenging the proposed causes of the PCR plateau phase. *Biomol Detect Quantif*. 2019. V.17. 100082. doi: 10.1016/j.bdq.2019.100082
18. Kainz P. The PCR plateau phase - towards an understanding of its limitations. *Biochim Biophys Acta*. 2000. V.1494(1-2). P.23-27. doi: 10.1016/s0167-4781(00)00200-1
19. Lyamichev V, Brow MA, Dahlberg JE. Structure-specific endonucleolytic cleavage of nucleic acids by eubacterial DNA polymerases. *Science*. 1993. V.260(5109). P.778-783. doi: 10.1126/science.7683443
20. Lyamichev V, Brow MA, Varvel VE, Dahlberg JE. Comparison of the 5' nuclease activities of taq DNA polymerase and its isolated nuclease domain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999. V.96(11). P.6143-6148. doi: 10.1073/pnas.96.11.6143
21. 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.145-157. doi: 10.1016/j.jbbm.2003.12.005
22. Morrison C, Gannon F. The impact of the PCR plateau phase on quantitative PCR. *Biochim Biophys Acta*. 1994. V.1219(2). P.493-498. doi: 10.1016/0167-4781(94)90076-0
23. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*. 1987. V.155. P.335-350. doi: 10.1016/0076-6879(87)55023-6
24. Mullis KB. The polymerase chain reaction in an anemic mode: how to avoid cold oligodeoxyribonuclear fusion. *PCR Methods Appl*. 1991. V.1(1). P.1-4. doi: 10.1101/gr.1.1.1
25. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 1985. V.230(4732). P.1350-1354. doi: 10.1126/science.2999980
26. Sakhabutdinova A.R., Chemeris D.A., Chemeris A.V., Garafutdinov R.R. PCR enhancers. I. General information. *Biomics*. 2023. T.15(3). C. 218-223. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2023-20 (In Russian)
27. Sikorsky JA, Primerano DA, Fenger TW, Denvir J. DNA damage reduces Taq DNA polymerase fidelity and PCR amplification efficiency. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007. V.355(2). P.431-437. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.01.169
28. Sikorsky JA, Primerano DA, Fenger TW, Denvir J. Effect of DNA damage on PCR amplification efficiency with the relative threshold cycle method. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004. V.323(3). P.823-830. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.08.168
29. Spaete RR, Frenkel N. The herpes simplex virus amplicon: a new eucaryotic defective-virus cloning-amplifying vector. *Cell*. 1982. V.30(1). P.295-304. doi: 10.1016/0092-8674(82)90035-6.