



## РАЗНООБРАЗИЕ МЕТОДОВ ДЕТЕКЦИИ ПОЛИМОРФНЫХ НУКЛЕОТИДОВ В ИЗВЕСТНЫХ СНИПАХ. III. АЛЛЕЛЬ-СПЕЦИФИЧНАЯ ПЦР

<sup>1</sup>Чемерис Д.А., <sup>2</sup>Гарафутдинов Р.Р., <sup>2</sup>Кулуев А.Р., <sup>2</sup>Сахабутдинова А.Р., <sup>2</sup>Кулуев Б.Р., <sup>2</sup>Чемерис А.В.

<sup>1</sup>ООО «Максим Медикал», Россия, 123423, Москва, ул. Народного Ополчения, д. 34, стр. 1

<sup>2</sup>Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Россия, 450054, Уфа, пр. Октября, 71  
E-mail: [chemeris@anrb.ru](mailto:chemeris@anrb.ru)

### Резюме

Замены одиночных нуклеотидов (SNP) составляют наибольшую долю полиморфизма ДНК практически любых организмов, включая человека, и оказывают заметное влияние на их жизненный статус. Детекция уже известных полиморфных нуклеотидов (SNP-типирование) приобретает важное значение, чем объясняется чрезвычайно большое разнообразие существующих методов анализа SNP. Одним из наиболее широко применяемых подходов является аллель-специфичная ПЦР (АС-ПЦР) с праймерами, характеризующимися различиями в строении и обусловленной этим способностью дискриминировать полиморфные нуклеотиды в ДНК. АС-ПЦР реализована во множестве вариантов (около полусотни), кратко рассмотренных в данном обзоре.

**Ключевые слова:** ДНК, однонуклеотидный полиморфизм, ОНП, снп, ПЦР, аллель-специфичная ПЦР, АС-ПЦР, SNP-типирование

**Цитирование:** Чемерис Д.А., Гарафутдинов Р.Р., Кулуев А.Р., Сахабутдинова А.Р., Кулуев Б.Р., Чемерис А.В. Разнообразие методов детекции полиморфных нуклеотидов в известных снипах. III. Аллель-специфичная ПЦР // Биомика. 2021. Т.14(1). С. 32-51. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2022-2

© Авторы

## THE DIVERSITY OF METHODS FOR THE DETECTION OF POLYMORPHIC NUCLEOTIDES IN THE KNOWN SNPs. III. ALLELE-SPECIFIC PCR

<sup>1</sup>Chemeris D.A., <sup>2</sup>Garafutdinov R.R., <sup>2</sup>Kuluev A.R., <sup>2</sup>Sakhabutdinova A.R., <sup>2</sup>Kuluev B.R., <sup>2</sup>Chemeris A.V.

<sup>1</sup>Maxim Medical LLC, 34-1 Narodnogo Opolcheniya str., Moscow, 123423, Russia

<sup>2</sup>Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, Russia, Ufa, 450054, 71 Pr. Oktyabrya  
E-mail: [chemeris@anrb.ru](mailto:chemeris@anrb.ru)

### Resume

Single nucleotide substitutions (SNPs) account for the largest share of DNA polymorphism in virtually any organism, including humans, and have a significant impact on their life status. Detection of already known polymorphic nucleotides (SNP typing) is of great importance, which explains the extremely wide variety of existing methods for SNP analysis. One of the most widely used approaches is allele-specific PCR (AS-PCR) with primers characterized by differences in structure and the resulting ability to discriminate polymorphic nucleotides in DNA. AS-PCR is implemented in a variety of variants (about fifty), which are briefly considered in this review.

**Keywords:** DNA, single-nucleotide polymorphism, SNP, PCR, allele-specific PCR, ASPCR, SNP typing

**Citation:** Chemeris D.A., Garafutdinov R.R., Kuluev A.R., Sakhabutdinova A.R., Kuluev B.R., Chemeris A.V. The diversity of methods for the detection of polymorphic nucleotides in the known SNPs. III. Allele-specific PCR. *Biomics*. 2022. V.14(1). P. 32-51. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2022-2 (In Russian)

## © Authors

### Введение

Важность генотипирования однонуклеотидных замен в геномах разных организмов и в первую очередь у человека уже давно не вызывала сомнений, и поэтому практически сразу после разработки метода ПЦР с использованием термостабильной ДНК полимеразы [Saiki et al., 1988] стали появляться публикации, в которых описывалось использование аллель-специфичной ПЦР (АС-ПЦР) с аллель-специфичными праймерами, причем большое количество статей пришлось на 1989 г., и поэтому в ряде случаев мы сочли правильным давать информацию о сроках поступления некоторых рукописей в редакции журналов. Фактически в конце 1988 г. и в начале 1989 г. экспериментаторы в разных странах независимо друг от друга озаботились разработкой удобных методов детекции однонуклеотидных замен при помощи ПЦР и аллель-специфичных праймеров.

О существовании подобных обзорных статей, посвященных АС-ПЦР, где главенствующую роль играет организация праймерных структур и были бы рассмотрены практически все варианты ее проведения, нам неизвестно. В уже упоминавшейся нами во вводной статье к генотипированию однонуклеотидного полиморфизма [Гарафутдинов и др. (Garafutdinov et al.), 2021] отечественной интернет-публикации Т.Бородиной ([http://chegdomyn.narod.ru/pmb/review/04\\_03.html](http://chegdomyn.narod.ru/pmb/review/04_03.html)), посвященной в целом различным методам детекции полиморфных нуклеотидов, АС-ПЦР отведен один небольшой абзац о девяти строках.

Известно, что наиболее критичной областью практически любых праймеров является их 3'-конец, поскольку именно к нему в случае его спаривания с матрицей ДНК полимеразы присоединяет очередные нуклеотиды. Влияние 3'-конца праймеров на эффективность амплификации и вклад в этот процесс находящихся в этом месте определенных нуклеотидов, рассмотрены нами довольно подробно ранее [Гарафутдинов и др. Garafutdinov et al., 2019] и здесь коснемся лишь вариантов АС-ПЦР, применяемых непосредственно для генотипирования в виде детекции полиморфных нуклеотидов в снипах (SNP – Single-Nucleotide Polymorphism, читаемый как «снип»<sup>1</sup>), поскольку с помощью таких

дискриминирующих праймеров удастся выявлять нахождение в конкретном месте того или иного нуклеотида, исходя из протекания или непротекания амплификации специфичного участка ДНК, что контролируется обычным и капиллярным гель-электрофорезом, микрофлюидными чипами, по флуоресценции в режиме реального времени и прочими многочисленными способами.

Но прежде следует уделить некоторое внимание дискриминирующим способностям тех или иных нуклеотидов, оказывающихся на 3'-конце неспаренными с матрицей, представленной в виде определенного участка ДНК.

### Дискриминационные различия неканонических пар азотистых оснований

ДНК, будучи в норме двухцепочечной структурой, образует в составе двойной спирали канонические пары азотистых оснований – аденин : тимин и гуанин : цитозин. Однако при проведении ПЦР можно намеренно вносить в праймерные последовательности нуклеотиды, которые не будут в определенных местах комплементарны амплифицируемой матрице и наиболее важным расположением таковых служит 3'-конец праймера, удлиняемый ДНК полимеразой, необладающей редактирующей активностью, хотя как будет видно из дальнейшего изложения и подобные ферменты могут использоваться для проведения АС-ПЦР. При этом разные неканонические пары характеризуются различиями в прочности их образования, что отражено в табл. 1.

Как можно видеть из табл. 1, где приведены все восемь<sup>2</sup> возможных вариантов нахождения тех или иных неспаривающихся нуклеотидов в матрице и праймере, эти сочетания в силу структурных особенностей азотистых оснований и законов термодинамики заметно различаются по дискриминирующим способностям. Фактически каждый нуклеотид при его взаимодействии с некомплементарными ему азотистыми основаниями характеризуется несколькими степенями дискриминации – от очень сильной до очень слабой. Хотя в литературе

SNP используется также аббревиатура «ОНП» (однонуклеотидный полиморфизм)

<sup>2</sup> с учетом расположения неспариваемых нуклеотидов либо в матрице, либо в праймере таковых будет уже 12, поскольку добавятся С·А, G·А, Т·С и Т·G.

<sup>1</sup> В русскоязычной литературе наряду со снипами и

можно встретить и немного отличающиеся от этих оценки дискриминирующих способностей разных азотистых оснований. Так, в одной из работ сообщается, что комбинации А·G, и С·С уменьшают выход ПЦР продуктов в 100 раз, тогда как А·С только в 20 раз, а остальные комбинации мало влияют на эффективность амплификации [Kwok et al., 1990]. Другие авторы получили несколько иные результаты, причем в их экспериментах весьма существенные различия дискриминирующих способностей азотистых оснований были в зависимости от того, где находился какой нуклеотид – на матрице или в праймере [Huang et al., 1992].

Ранее на примере дуплексов матрица/праймер была оценена скорость работы ДНК полимеразы (присоединения дНМФ к 3'-концу), которая по сравнению с канонической парой А·Т снижалась для G·Т, С·Т и Т·Т приблизительно в 200, 1400 и 2500 раз соответственно [Petruska et al., 1988]. Безусловно, при детекции снипов это по возможности необходимо принимать во внимание. Причем нахождение конкретных некомплементарных нуклеотидов в составе праймера или матрицы характеризуется неодинаковым влиянием на протекание ПЦР из-за стекинг-взаимодействий и наличия так называемого висящего нуклеотида, чему мы ранее уделили значительное внимание [Гарафутдинов и др. (Garafutdinov et al.), 2019]. Здесь еще нужно заметить, что существует большое количество специализированных компьютерных программ дизайна праймеров в том числе для аллель-специфичной ПЦР, рассмотренных нами ранее [Чемерис и др. (Chemeris et al.), 2016], ассортимент которых за прошедшие годы еще увеличился, что требует уже отдельной статьи для их описания.

Таблица 1.  
Степень дискриминации полиморфных нуклеотидов при АС-ПЦР в зависимости от природы 3'-концевого нуклеотида в праймере

Table 1. - The degree of discrimination of polymorphic nucleotides in AS-PCR depending on the nature of the 3'-terminal nucleotide in the primer

Неспаривания Mismatches	Степень дискриминации Discrimination level
А·А	средняя medium
А·С	слабая weak
А·G	очень сильная very strong
С·С	сильная strong
С·Т	очень сильная very strong
G·G	средняя medium
G·Т	очень слабая very weak
Т·Т	очень сильная very strong

**Выявление однонуклеотидных замен с помощью вариантов аллель-специфичной ПЦР**

Прежде чем переходить к рассмотрению многочисленных вариантов АС-ПЦР, пожалуй, стоит привести некую обобщенную схему ее проведения, используемую в большинстве работ. Так, АС-ПЦР характеризуются аллель-специфичными праймерами с дискриминирующими нуклеотидами, расположенными либо только на 3'-конце и/или вблизи него, где «и» означает, что, помимо ключевого нуклеотида на 3'-конце, в этой зоне праймеров в положениях от -1 до -3 могут дополнительно присутствовать один либо два неспаривающихся нуклеотида, что на рис. 1 обозначено звездочками. Хотя есть и подходы с локализацией дискриминирующих нуклеотидов в средней части праймеров.



Рис. 1. Схема проведения наиболее распространенных вариантов АС-ПЦР (пояснения в тексте)  
Fig. 1. The scheme of the most common variants of AS-PCR (explanations in the text)

Впервые АС-ПЦР (ASPCR – Allele-Specific) была предложена в 1989 г.<sup>3</sup> [Wu et al., 1989]. В той работе авторы использовали аллель-специфичные праймеры с А·А и Т·Т неспариваниями. При этом только один праймер из пары нес дискриминирующий нуклеотид на 3'-конце. В качестве рекомендации было высказано предложение не использовать неспаривания нуклеотидов G·T, поскольку эта неканоническая пара наиболее прочна, а выбирать в таких случаях комплементарную цепь, где для того же полиморфного нуклеотида можно конструировать праймеры с С или с А дискриминирующими нуклеотидами.

Позже, применив в такой АС-ПЦР флуоресцентно-меченные праймеры и предложив мультиплексный вариант, другие авторы назвали свой подход MASPCR (multiple allele-specific) [Fortina et al., 1992]. Недавно предложен схожий вариант MASPCR со вложенными праймерами, получивший название NMAS-PCR (Nested) [Sinha et al., 2019]. В другой апрельской статье 1989 г. был описан способ выявления однонуклеотидных мутаций, не получивший своего названия, и также характеризующийся помещением на 3'-конце праймера дискриминирующих нуклеотидов [Ehlen, Dubeau, 1989]. Важным отличием этой работы явилось наличие способных спариваться со всеми нуклеотидами дезоксинозинов в целом ряде мест, как в прямом, так и в обратном праймерах для детекции мутаций в ортологичных генах, отличающихся по ряду позиций нуклеотидов. В августе 1989 г.<sup>4</sup> вышла подготовленная другими авторами статья, в которой также описывалась аллель-специфичная ПЦР с дискриминирующими нуклеотидами на 3'-конце праймеров [Okayama et al., 1989].

В конце того же 1989 г. была опубликована еще одна статья, посвященная АС-ПЦР, свой вариант которой авторы, процитировав упомянутую выше работу Wu и соавт., назвали ASA (Allele Specific Amplification) [Ruano, Kidd, 1989], однако принципиальных отличий этот метод от предложенного ранее ASPCR не содержал. Позднее метод ASA АС-ПЦР неоднократно совершенствовался и в частности в двух независимо выполненных работах он был преобразован в однопробирочные варианты, названные SAS-PCR (single-step/single-tube, allele-specific amplification) [Sasvari-Szekely et al., 2000] и single tube bi-directional ASA [Waterfall, Cobb, 2001].

Метод АС-ПЦР с одним дискриминирующим

нуклеотидом на 3'-конце можно считать классическим вариантом детекции мутаций и наиболее широко применяющимся. При этом детекция таких АС-ПЦР продуктов может проводиться разными способами, среди которых весьма популярен гель-электрофорез, включая его скоростной микрофлюидный вариант [Medintz et al., 2000]. Однако в некоторых случаях для разделения продуктов АС-ПЦР необходимы различия в размерах аллель-специфичных ампликонов, достигаемые за счет использования дискриминирующих праймеров, несущих на 5'-конце экстрапоследовательности разной длины, как, например, в работе Dutton и Sommer [1991].

В варианте АС-ПЦР MS-PCR (Mutagenically Separated) для детекции мутаций было также предложено использовать имеющие разную длину праймеры с неспаривающимися и дискриминирующими нуклеотидами, что приводило к образованию ампликонов разного размера, и осуществлять их разделение гель-электрофорезом [Rust et al., 1993]. Отечественными авторами предложен иной способ изменения электрофоретической подвижности аллель-специфичных ампликонов путем пришивки к одному из аллель-специфичных праймеров монометилового эфира полиэтиленгликоля, что оказалось равносильно удлинению ампликона на 80-90 п.н. [Бреннер и др. (Brenner et al.), 2005].

Более производительные варианты АС-ПЦР основаны на использовании аллель-специфичных праймеров, меченных для разных полиморфных нуклеотидов различными флуорохромами, позволяющими в режиме реального времени детектировать ОНП. Так, весьма широко используемым методом для детекции полиморфных нуклеотидов в снипах являются KASP (KBioscience Allele Specific PCR<sup>5</sup>) или KASPar технология [He et al., 2014; Smith, Maughan, 2015]. В основе KASP (KASPar) технологии<sup>6</sup> лежит использование неких универсальных праймеров, меченных разными для разных полиморфных нуклеотидов флуорохромами, до определенного этапа свечение которых гасится тушителями флуоресценции, находящимися на комплементарных им последовательностях за счет формирования дуплексной структуры. Помимо них в реакционной смеси присутствуют специфичные к участку ДНК с ОНП три других праймера, один из которых общий, а два других - аллель-специфичные, при этом несущие экстрапоследовательности, на которых в ходе ПЦР через цикл будет отжигаться тот

<sup>3</sup> Рукопись этой статьи была получена редакцией журнала 12 декабря 1988 г.

<sup>4</sup> Рукопись этой статьи поступила в редакцию журнала 21 декабря 1988 г.

<sup>5</sup> иногда расшифровываемая также как Kompetitive Allele Specific PCR [Semagn et al., 2014]

<sup>6</sup> в настоящее время поставляемой компанией LGC Genomics

или иной либо оба флуоресцентно-меченных праймера (для гомо- и гетерозигот соответственно), освобождаясь от комплементарных им олигонуклеотидов с тушителем флуоресценции благодаря конкуренции и большему числу комплементарных им азотистых оснований на ДНК-матрице. На эту технологию еще в 2006 г. был получен Европейский патент EP 1 726 664 A1. Но еще ранее данный принцип временного гашения с использованием двух цепей ДНК путем смещения олигонуклеотида с тушителем был описан при проведении ПЦР в реальном времени, но тогда это был гибридационный зонд [Cheng et al., 2004].

Учитывая значительную популярность KASP технологии, стоит остановиться на некоторых результатах генотипирования ОНП, с ней полученных. Так, KASP успешно применялся для обнаружения полиморфных нуклеотидов в снипах, связанных с хозяйственно-полезными признаками у мягкой пшеницы и других растений, при этом выбор таких участков генома в ряде случаев осуществлялся после высокопроизводительного анализа ОНП с помощью ДНК-чипов [Rasheed et al., 2016; Roncallo et al., 2019; Yang et al., 2020; Xiong et al., 2021]. И это только часть подобных работ, опубликованных в последние годы.

Недавно предложен метод ASQ (Allele-Specific q-PCR), во многом напоминающий KASP, но имеющий ряд отличий в виде расположения дискриминирующего нуклеотида на предпоследней позиции от 3'-конца праймера, присутствия в универсальной пробе дополнительной последовательности из шести нуклеотидов, служащих баркодами, причем таковых в одной реакции допускается четыре разных вкупе с соответствующими флуорохромами, что позволяет генотипировать не только биаллельные снипы [Kalendar et al., 2022].

В разных АС-ПЦР размеры ампликонов различались значительно, но преимущественно были довольно крупными. Так, в одной из цитированных выше статей [Waterfall, Cobb, 2001] ампликоны, образующиеся с двумя парами праймеров имели размеры 267 и 517 п.н., что излишне много. Задавшись целью детектировать ОНП в криминалистических образцах, ДНК в которых может быть фрагментированной, другие авторы выбрали места отжига 18 пар праймеров, расположенных друг от друга на расстоянии от 40 до 67 п.н. [Asari et al., 2008]. Другой особенностью этой работы было использование прямых и обратных праймеров с экстрапоследовательностями uni9, uni11 и uni13, для которых имелись универсальные репортерные праймеры, меченные разными флуорохромами, что позволило назвать данный метод URP/ASA. Нами

также для АС-ПЦР использовались система сближенных праймеров с дискриминирующими нуклеотидами на 3'-конце, что актуально при исследовании древней или разрушенной ДНК [Галимова и др. (Galimova et al.), 2014].

Возвращаясь в 1989 г., нужно заметить, что в работах одной группы авторов [Haliassos et al., 1989<sup>7</sup>; 1989a] для проведения АС-ПЦР были сконструированы один общий (обратный) и два прямых праймера и на 3'-конце последних располагались дискриминирующие нуклеотиды, один из которых приводил к возникновению сайта рестрикционной эндонуклеазы, что превращало этот метод в ПЦР-ПДРФ, варианты которого рассмотрены в другой нашей статье [Сахабуддинова и др. (Sakhabutdinova et al.), 2021].

В еще одной работе 1989 г. [Gibbs et al., 1989], поступившей в редакцию 4 января 1989 г. и вышедшей практически одновременно со статьями Wu и соавт. [1989] и Ehlen и Dubeau [1989], было предложено использовать в ПЦР так называемое конкурентное праймирование COP (Competitive Oligonucleotide Priming). Особенностью этого метода было применение вместе с общим праймером двух других, отличающихся между собой заменой одного нуклеотида в средней части. Авторы посчитали, что неполностью спаривающийся праймер будет хуже инициировать амплификацию и если один из них пометить радиоактивностью, то можно понять после гель-электрофореза и радиоавтографии какой искомым нуклеотид присутствовал в матрице. Использование флуоресцентных меток и множественных аллель-специфичных праймеров привело позже к разработке метода M-COP (Multiple) [Fauser, Wissinger, 1997], позволяя значительно быстрее получать конечные результаты, не прибегая к гель-электрофорезу, отнимающему немало времени.

В том же апрельском номере журнала *Nucleic Acids Research* 1989 г., где опубликована статья Gibbs и соавт., также была еще описана подобная АС-ПЦР, получившая название ARMS (Amplification Rerefractory Mutation System) [Newton et al., 1989]<sup>8</sup>. Ее главным отличием было расположение недалеко от 3'-конца праймера с дискриминирующим нуклеотидом еще одного неспаривания, что позволило заметно повысить специфичность амплификации. Также стоит заметить, что одна из праймерных систем в цитируемой работе была сконструирована так, что имела перекрытие в один нуклеотид, являющийся как раз переменным. В дальнейшем метод ARMS

<sup>7</sup> рукопись этой статьи поступила в редакцию 4 апреля 1989 г.

<sup>8</sup> рукопись данной статьи была получена редакцией журнала 23 февраля 1989 г.

получил довольно мощное развитие и на его основе появились разнообразные варианты. Так, в одной из работ [Lo et al., 1992] были предложены варианты double ARMS и DARMSI (Double ARMS Inverse), второй из которых основан на разработанной ранее обращенной ПЦР [Ochman et al., 1988; Triglia et al., 1988]. Возможность детектирования одновременно несколько мутаций с помощью метода ARMS была показана разными авторами и получила название MARMS (Multiplex) [Ferrie et al., 1992; Fortina et al., 1992a]. Например, метод MARMS позже позволил уверенно дифференцировать пять видов женьшеней [Zhu et al., 2004].

Еще в 1992 г. для аллель-специфичной амплификации была предложена тетрапраймерная ПЦР [Ye et al., 1992]. Ее главным отличием от ARMS было расположение неспариваемого нуклеотида в средней части праймера, а не на 3'-конце. Данный метод заключался в использовании на первой стадии ПЦР (10 циклов) фланкирующих праймеров с высокой температурой отжига (P1 и P2), что приводило к наработке подобно вложенной ПЦР первоначального ампликона, служащего в дальнейшем матрицей. Так, на второй стадии (20 циклов) температура отжига снижалась настолько, что присутствующие в смеси внутренние праймеры (P3 и P4) с дискриминирующими нуклеотидами в средней части могли отжигаться только на полностью комплементарных им сайтах, приводя к специфичной амплификации дополнительно двух фрагментов, имеющих разную длину. Таким образом, у гетерозигот нарабатывались три ампликона – полноразмерный с двумя фланкирующими праймерами (P1 и P2), и два меньшего (неравного) размера, праймерами для которых служили – для одного фланкирующий (P1) и внутренний (P4) и для второго – фланкирующий P2 и внутренний P3. Спустя почти десятилетие, объединив тетрапраймерный вариант ПЦР и метод ARMS с его дискриминирующими праймерами, несущими неспариваемые нуклеотиды на 3'-конце и вблизи него, был предложен новый подход Tetra-primer ARMS PCR [Ye et al., 2001]. В нем также у гетерозигот выявлялись три ампликона разного размера и по два у гомозигот. Используя этот принцип, был изучен полиморфизм пяти снипов у 132 образцов ячменя для установления полезных сельскохозяйственных признаков [Chiarratino et al., 2004]. Этот же метод, который авторы называли как T-ARMS, был применен и для ДНК человека, причем образцы исследовались также с помощью ПЦР-ПДРФ и ASA-PCR, при этом был сделан вывод о некоторых преимуществах использования T-ARMS [Peruzzi et al., 2010]. Предложение использовать в АС-ПЦР в одной реакции шесть праймеров превратило T-ARMS в H-

ARMS (Hexa) [Piccioli et al., 2008]. Недавно сообщено о пентапраймерной или P-ARMS, рассчитанной на детекцию триаллельного ОНП [Yang et al., 2022].

Учитывая довольно высокую эффективность метода T-ARMS, специально была опубликована статья, содержащая руководство по применению данного подхода для детекции снипов [Medrano, de Oliveira, 2014.]. На этом усовершенствования метода T-ARMS не закончились и был предложен его модифицированный вариант, который был назван МТРА (Modified Tetra-Primers ARRMS) [Mesrian Tanha et al., 2015]. Его особенностью стало то, что в нем и внешние фланкирующие праймеры несли по одному неспаренному нуклеотиду вблизи 3'-конца, что, по мнению авторов, позволило выравнять условия протекания ПЦР. Описанные выше варианты ARMS предполагали использование гель-электрофореза для анализа результатов АС-ПЦР однако нельзя не упомянуть работу, в которой при проведении ARMS показана возможность колориметрической детекции в течение 5 минут образующегося в ходе ПЦР пирофосфата и ортофосфата с помощью молибдата аммония и красителя малахитового зеленого [Gibson et al., 1997]. Другой принцип детекции результатов ARMS АС-ПЦР с помощью твердофазной гибридизации получил название ASPUA (Allele-Specific PCR-based Universal Array) [Li et al., 2008].

Для анализа снипов было предложено также нечто среднее между тетрапраймерной ПЦР и ARMS в виде PCR-СТПП (Confronting Two-Pair Primers) [Hamajima et al., 2000; Hamajima, 2001]. В этой реакции использовались два внешних и два внутренних праймера, как в тетрапраймерной ПЦР и при этом формировались три типа ПЦР продуктов – полноразмерный ампликон с двумя внешними праймерами и два более коротких, имеющих отличающиеся размеры, образующиеся с прямым внешним и обратным внутренним праймерами (один) и другой – с прямым внутренним и с обратным внешним. При этом дискриминирующие нуклеотиды находились только на 3'-конце внутренних праймеров, причем перекрываясь. Позже этой группой авторов данный метод был модифицирован путем добавления в реакцию еще одного пятого праймера, отжигающегося на общей для всех остальных праймеров экстрапоследовательности, размещенной на их 5'-концах. Это позволило выравнять эффективности амплификации всех фрагментов и назвать данный вариант как ОРА-СТПП (One Primer Amplification) [Yin et al., 2012]. Сообщено об еще одном улучшении метода СТПП, заключающемся во введении одного неспаренного нуклеотида в позиции -3 от 3'-конца внутренних праймеров для усиления их дискриминирующих возможностей [Jiang et al., 2018]. Тем самым этот вариант стал еще более похож на

метод T-ARMS.

В ноябре все того же 1989 г. были опубликованы еще две статьи, в которых был описан метод АС-ПЦР с использованием праймеров, несущих или на самом 3'-конце или вблизи него один или два неспаренных нуклеотида, получивший название PASA (PCR Amplification of Specific Alleles) [Sommer et al., 1989]. Использование double PASA позволило вести уже гаплотипный анализ [Sarkar, Sommer, 1991]. В последующие годы совершенствование метода PASA продолжилось и появилось немало методических работ, где были детально рассмотрены различные аспекты этого варианта АС-ПЦР [Sarkar et al., 1990; Sommer et al., 1992; Bottema, Sommer, 1993]. Использование нескольких пар праймеров позволило создать мультиплексный вариант этой АС-ПЦР, названный как PAMSA (PCR Amplification of Multiple Specific Alleles) [Dutton, Sommer, 1991; Bottema et al., 1993]. В одной из работ неспаривающийся нуклеотид было предложено размещать в третьем положении от 3'-конца праймера, что позволило авторам такой вариант PAMSA назвать улучшенным [Okimoto, Dodgson, 1996]. Было показано, что после добавления в PASA третьего аллель-неспецифичного внешнего праймера повысилась достоверность выявления конкретных аллелей в ходе реакции амплификации [Zhu, Clark, 1996]. Применяв двунаправленную амплификацию, метод PASA был преобразован в Bi-PASA (Bidirectional) [Liu et al., 1997]. Позже double PASA был преобразован в MD-PASA (Multiple Double), что дало возможность также вести гаплотипный анализ сразу девяти полиморфных сайтов [Eitan, Kashi, 2002].

Несколько отличающийся подход к АС-ПЦР, рассчитанный на блокирование амплификации одного из аллелей (нормального) и выявление мутантного, основан на применении специальных олигонуклеотидов-блокаторов амплификации, которые отжигаются на участке ДНК между прямым и обратным праймерами в том месте, где находится искомая мутация, то есть являются аллель-специфичными [Seiyama et al., 1993]. Прямой и обратный праймеры имеют длину в 24 звена, а блокирующие олигонуклеотиды несколько короче - 18 звеньев, и к тому же они несут на 3'-концах дидезокси-группу и поэтому не удлиняются ДНК полимеразой. За счет небольшой разницы в температурах плавления олигонуклеотида-блокатора с нормальным и мутантным вариантами гена, последний приобретает некоторое преимущество вовлекаться в наработку ПЦР продукта. Схожий вариант детекции мутантных аллелей с помощью ПЦР с блокирующими олигонуклеотидами (Competitive Blocker PCR) был описан несколько позже [Orou et al., 1995]. Целая серия методологических работ по аллель-

специфичной блокирующей ПЦР (ACB-PCR – Allele-specific Competitive Blocker) была выполнена разными коллективами авторов [Parsons, Heflich, 1998; McKinzie, Parsons, 2002; Parsons et al., 2005; Myers et al., 2020]. В одной из работ использовался дискриминирующий блокирующий олигонуклеотид с LNA модификациями, что позволило назвать такой подход как LNA-CoPCR [Piadi et al., 2011]. Иной способ блокирования нежелательной амплификации при проведении АС-ПЦР заключался в присутствии в реакционной смеси в избытке дополнительного «депозитного» олигонуклеотида, образующего с соответствующими праймерами дуэльные структуры, создавая конкуренцию с матрицей ДНК за места отжига и тем самым обеспечивая некоторое преимущество в амплификации искомым аллелям [Imyanitov et al., 2002]. Несколько отличающийся тип блокатора для использования в АС-ПЦР получил название AS-NEPB-PCR (Non-Extendable Primer Blocker) [Wang et al., 2013].

Помимо широко применяемых ASPCR, ARMS, PASA и их многочисленных вариаций предлагались и другие подходы для проведения АС-ПЦР. Так, в одной из работ использовались праймеры с двумя неспаривающимися нуклеотидами, расположенными друг за другом на их 3'-конце, что получило название MAMA (Mismatch Amplification Assay) [Cha et al., 1992]. Объединив технологию TaqMan с праймерами, предложенными в MAMA методе, появилась возможность регистрировать результаты в режиме реального времени и назвать этот новый вариант как TaqMAMA [Glaab, Skopek, 1999]. В литературе можно встретить еще один вариант АС-ПЦР – MASA (Mutant-Allele-Specific Amplification) [Takeda et al., 1993]. В этой работе использовались праймеры с дискриминирующими нуклеотидами или непосредственно на 3'-конце или в положении -1 от него. Детекция мутаций с помощью двух параллельных ПЦР с использованием в каждой по одному аллель-специфичному праймеру из пары с дискриминирующим нуклеотидом на 3'-конце получила название ASPA (Allele-Specific Primer Amplification) [Simsek et al., 1994]. Для улучшенной детекции снипов в одной из работ была предложена ПЦР с системой с отжигающимся контрольным праймером ACP (Annealing Control Primer) [Hwang et al., 2003]. Авторы посчитали, что наличие в средней части составных праймеров пяти остатков инозина способствует увеличенной специфичности процесса амплификации. Нельзя не упомянуть метод PCR-SSP (Sequence-Specific Primers), в котором использовались праймеры с отличающимся нуклеотидом в положении -1 или целым рядом замен в центральной части олигонуклеотида [Zetterquist, Olerup, 1992].

Для детекции снипов на основе ПЦР был

также разработан простой метод SAP (Simple-Allele-discriminating PCR) [Bui, Liu, 2009]. Его суть заключалась в использовании трехпраймерной амплификации, в которой один праймер был общим, а два других представляли собой праймеры с дискриминирующим нуклеотидом на их 3'-конце, соответствующему полиморфным нуклеотидам в биаллельных снипах, и несли дополнительно по одному неспаривающемуся нуклеотиду в положении -2. В этой работе был также предложен более производительный вариант подобной детекции снипов, основанный на применении флуоресцентных красителей и их гасителей в праймерах со шпилечной структурой типа Amplifluor, описанной ранее [Nazarenko et al., 1997]. Дальнейшее развитие АС-ПЦР с использованием Amplifluor праймеров получила в работе других авторов [Myakishev et al., 2001]. Схожий принцип шпилечного устройства праймеров был применен для АС-ПЦР, который можно назвать AS-HP-PCR (Hairpin Primer), особенностью которого является нахождение в составе шпилечного праймера с дискриминирующим (на 3'-конце) нуклеотидом находящегося в экстрапоследовательности выпетленного цитозина, меченного подходящим флуорохромом, что приводит через цикл к формированию в этом месте полноценной двухцепочечной структуры и тушению флуоресценции комплементарным гуанином [Takei et al., 2012].

Использование ПЦР с понижающейся температурой отжига и элонгацией аллель-специфичных праймеров с дискриминирующими нуклеотидами в положениях -2 и -3 позволило разработать новый вариант АС-ПЦР, назвав его ASPCR-MP (Mismatch Primers) [Ishiguro et al., 2005]. Также понижение температуры отжига в методе aQRT-PCR (antiprimer Quencher) дало возможность исключать флуоресценцию не вступивших в реакцию амплификации праймеров в ходе аллель-специфичной ПЦР в реальном времени за счет присутствия в реакционной смеси так называемых антипраймеров, несущих гаситель праймерного флуорохрома, тогда как образовавшиеся ампликоны, имеющие двухцепочечную структуру продолжали светиться [Li, Makrigiorgos, 2007]. В этой работе применялась нестандартная последовательность смены температур при термоциклировании в ходе ПЦР. Так, после этапа денатурации происходил отжиг праймеров и их элонгация при 60°C и затем температура реакционной смеси снижалась до 50°C для отжига на свободных праймерах антипраймеров и детекции изменения флуоресценции.

Заметное повышение специфичности выявления снипов при проведении АС-ПЦР было достигнуто с использованием праймеров, содержащих

на 3'-конце LNA (Locked Nucleic Acid) или ENA (Ethylene Nucleic Acid) модификации [Latorra et al., 2003; Koizumi et al., 2005; Rupp et al., 2006; Nakitandwe et al., 2007], ввиду образования более прочных связей такими нуклеотидами с матрицей.

Казалось бы, что использование в АС-ПЦР ДНК полимераз с экзонуклеазной редактирующей активностью может приводить к получению неверных результатов ввиду удаления из состава праймеров таких неспариваемых на их 3'-концах нуклеотидов, однако если праймеры будут нести соответствующие модификации, блокирующие 3→5-экзонуклеазную активность, то с помощью таких ДНК полимераз также можно проводить детекцию снипов и подобных работ уже немало. Было показано, что если использовать Pfu полимеразу, обладающую редактирующей активностью, и модифицированный по 3'-концу дискриминирующий праймер, неспособный к удлинению, то в случае неспаривания последнего нуклеотида такая ДНК полимераз его удалит и начнет строить новую цепь, тогда как если нуклеотид будет комплементарным матрице, то его удаление будет происходить менее эффективно и в итоге разница в элонгации таких аллелей будет вполне заметна [Bi, Stambrook, 1997]. Этот метод выявления известных мутаций был назван PR-PCR (Proof-Reading), а в качестве блокирующих групп применялись -NH<sub>2</sub>, -SH или -P. Ранее схожий подход для детекции мутаций с помощью ПЦР с термостабильной Tli полимеразой, также обладающей редактирующей активностью, был использован другими авторами [Wegmuller et al., 1995]. Дополнительным отличием явилось то, что праймеры в их случае были мечены по 3'-концу дигоксигенином, который затем после гель-электрофореза выявлялся специальным набором с хромогенным субстратом.

Способность удаления неспаренных нуклеотидов на 3'-конце праймера некоторыми термостабильными ДНК полимеразми с редактирующей активностью была использована для детекции снипов в методе, получившем название 3'-LEPEA (3'-Labeled Exo<sup>+</sup> Primer Extension Assay) [Zhang, Li, 2001; Zhang et al., 2003]. В этом случае праймер метился по 3'-концу или подходящим радионуклидом (например, тритием) или флуорохромом и если дискриминирующий нуклеотид на 3'-конце был спарен с матрицей, то шла элонгация и сохранялась метка, тогда как неспаренный меченный нуклеотид удалялся редактирующей активностью ДНК полимеразы и ампликон оказывался немеченным. Схожую работу выполнили другие авторы, отличием которой было то, что на заключительном этапе детекция снипов велась измерением поляризации флуоресценции [Cahill et al.,

2004]. Несколько иной подход к детекции снипов с помощью ДНК полимеразы с редактирующей активностью получил название On/off switch assay [Zhang, Li, 2003; Zhang et al., 2003; Li et al., 2005]. Его особенностью было то, что, помимо нахождения на 3'-конце праймера дискриминирующих нуклеотидов, вместо фосфодиэфирных присутствовали фосфотиоатные связи, способные удлиняться, но неподдающиеся экзонуклеазному расщеплению. В результате праймеры с неспаренным 3'-концом в амплификацию не вовлеклись. Однако в этой связи необходимо указать на статью других авторов [Gale, Tafoya, 2004], в которой было проведено исследование 15 разных ДНК полимераз производства нескольких фирм на предмет их пригодности для АС-ПЦР в варианте МАМА с аллель-специфичными праймерами с фосфотиоатными связями. В результате было обнаружено, что шесть ферментов, обладающие экзонуклеазной активностью, хотя и в разной степени, но все же продемонстрировали редактирующую активность, удаляющую неспаренные нуклеотиды. Был предложен и другой способ детекции снипов Off/on switch assay, в котором напротив ПЦР не проходила с полностью спаренными праймерами, а праймеры с отсутствием на 3'-конце ОН-группы, названные ими инертными - несущими на 3'-конце дискриминирующий дидезоксинуклеотид, обеспечивали амплификацию [Zhang et al., 2004; Lin-Ling et al., 2005]. Для более подробного знакомства с методами детекции снипов с помощью ДНК полимераз с редактирующей активностью можно прочесть краткий обзор, подготовленный разработчиками большинства описанных здесь подходов [Zhang et al., 2005]. Однако уже после выхода того обзора был разработан метод PP-ASA (Phosphorotioate Proofreading Allele-Specific Amplification), в котором аналогично дискриминирующие нуклеотиды в праймерах были защищены за счет фосфотиоатных связей и неподвержены разрушению редактирующей активности ДНК полимераз [Hu et al., 2007].

Помимо экзонуклеазной активности некоторых ДНК полимераз для удаления нуклеотида на 3'-конце праймера в случае если он не дает идти полимеризации ДНК можно использовать реакцию пирофосфоролита. Так, в одной из работ [Liu, Sommer, 2004] было показано, что аллель-специфичный праймер, несущий на 3'-конце дидезоксинуклеотид (не позволяющий происходить присоединению очередного азотистого основания), будет удлиняться модифицированной Taq полимеразой благодаря пирофосфоролиту, тогда как неспаренный нуклеотид в этой позиции не подвержен пирофосфоролиту и будет оставаться нетронутым. Авторы назвали свой метод Bi-PAP-A (Bidirectional Pyrophosphorolysis-Activated

Polymerization Allele-specific amplification) и отметили, что он способен обнаруживать даже очень редкие мутации [Liu, Sommer, 2004a].

Довольно оригинальный, хотя и неоднозначный подход к детекции снипов получил название CASPA (Consumed Allele-Specific Primer Analysis) [Watanabe et al., 2001]. В этом случае проводилась оценка расходования тех или иных праймеров с помощью капиллярного секвенатора, поскольку праймеры были мечены по 5'-концу флуорохромом, а также несли в 5'-области разное количество некомплементарных экстрануклеотидов (для обеспечения различий по длине). Ввиду малого размера детектируемых праймеров время электрофореза было очень коротким и по соотношению оставшихся и «выработанных» праймеров судили о присутствии того или иного полиморфного нуклеотида в снипе.

Для анализа снипов с помощью микроэрежной технологии, сопряженной с резонансной спектроскопией поверхностных плазмонов, был предложен метод АС-ПЦР (L-DNA-tagged PCR - LT-PCR) с использованием дискриминирующего химерного праймера [Hayashi et al., 2008], основанный на эффекте преодоления ДНК-полимеразой участка с L-конформацией цепи ДНК, в результате чего итоговый ампликон нес на одном из концов данный выступающий участок, который служил меткой для гибридизации на чипе с комплементарным ему олигонуклеотидом, также представленным в L-конформации [Hayashi et al., 2007]. Такой подход с использованием химерного праймера с L- и D-конформациями цепей ДНК, не отжигающимися друг с другом, позволяет не опасаться возможной и при этом нежелательной гомологии нуклеотидной последовательности всего ампликона с находящимися на чипе L-олигонуклеотидами.

### Заключение

Подводя итог рассмотрения метода АС-ПЦР, можно прийти к заключению, что различных вариантов этой реакции существует около полусотни, однако точный подсчет представляется практически невозможным ввиду незначительных отличий между методами, предложенными разными авторами и не вошедшими в таблицу 2, в том числе из-за отсутствия конкретных обозначений для них, включая аббревиатуры.

Перечисление такого большого количества методов АС-ПЦР, в некоторых случаях лишь незначительно отличающихся друг от друга, в том числе и предложенных довольно давно, на самом деле представляется весьма важным, поскольку, находясь на новом уровне технологических возможностей из тех давних решений можно что-то и почерпнуть.

Таблица 2  
 Детекция ОНП с помощью различных вариантов АС-ПЦР  
 Table 2 - Detection of SNP using various variants of AS-PCR

Метод / Method	Ссылка / Reference
ASPCR	Wu et al., 1989
ARMS	Newton et al., 1989
ASA	Ruano, Kidd, 1989
COP	Gibbs et al., 1989
PASA	Sommer et al., 1989
double PASA	Sarkar, Sommer, 1991
PAMSA	Dutton, Sommer, 1991; Okimoto, Dodgson, 1996
MASPCR	Fortina et al., 1992
DARMSI	Lo et al., 1992
MARMS	Ferrie et al., 1992; Fortina et al., 1992
Tetra-primer	Ye et al., 1992
MAMA	Cha et al., 1992
PCR-SSP	Zetterquist, Olerup, 1992
ACB-PCR	Seyama et al., 1993; Orou et al., 1995
MS-PCR	Rust et al., 1993
MASA	Takeda et al., 1993
ASP	Simsek et al., 1994
M-COP	Fausser, Wissinger, 1997
BI-PASA	Liu et al., 1997
PR-PCR	Bi, Stambrook, 1998
MutEx/ACB	Parsons, Heflich, 1998
TaqMAMA	Glaab, Skopek, 1999
CTPP	Hamajima et al., 2000
SAS	Sasvari-Szekely et al., 2000
T-ARMS	Ye et al., 2001
CASPA	Watanabe et al., 2001
MD-PASA	Eitan, Kashi, 2002
3'-LEPEA	Zhang, Li, 2001
ACP	Hwang et al., 2003
On/off switch assay	Zhang, Li, 2003; Zhang et al., 2003
ASPCR-MP	Ishiguro et al., 2005
Bi-PAP-A	Liu, Sommer, 2004
Off/on switch assay	Lin-Ling et al., 2005; Li et al., 2005
KASP/KASPar	Kbioscience Ltd., 2006 (EP 1 726 664 A1)
PP-ASA	Hu et al., 2007
aQRT	Li, Makgiorgos, 2007
LT-PCR	Hayashi et al., 2008
ASPUA	Li et al., 2008
H-ARMS	Piccioli et al., 2008
URP/ASA	Asari et al., 2009
SAP	Bui, Liu, 2009
LNA-CoPCR	Iliadi et al., 2011
AS-HP-PCR	Takei et al., 2012
OPA-CTPP	Yin et al., 2012
AC-NEPB-PCR	Wang et al., 2013
MTPA	Tanha et al., 2015
NMAS-PCR	Sinha et al., 2019
ASQ	Kalendar et al., 2022

Вне всякого сомнения, что АС-ПЦР при выявлении полиморфных нуклеотидов характеризуется большей гибкостью по сравнению с ПЦР-ПДРФ, не завися от наличия сайтов рестрикции. Также АС-ПЦР может иметь более высокую производительность, что в ряде работ было показано. Однако подчас плохая дискриминирующая способность некоторых праймеров приводит к амплификации неправильных аллелей и здесь главное значение приобретает нуклеотидная последовательность всего участка ДНК, содержащего ОНП, которая может оказаться непригодной ни для одного варианта АС-ПЦР, даже использующего всевозможные ухищрения по организации праймерных структур.

Некоей альтернативой АС-ПЦР служит довольно широко используемый другой вариант детекции снипов в виде однонуклеотидного удлинения праймеров, рассмотрению которого требует самостоятельной статьи.

#### Благодарности

Исследование выполнено в рамках государственного задания №122030200143-8 (тема № АААА-А21-121011990119-1) при поддержке гранта Минобрнауки РФ (соглашение № 075-15-2021-1066 от 28 сентября 2021 г.).

#### Литература:

1. Бреннер Е.В., Иванова Е.М., Пышный Д.В., Морозов И.В. Универсальный метод идентификации однонуклеотидных замен // Биоорг. Химия. 2005. Т. 31. № 2. С. 213-215.
2. Галимова А.А., Гарафутдинов Р.Р., Сахабутдинова А.Р., Чемерис А.В. Аллель-специфическая полимеразная цепная реакция с использованием системы сближенных праймеров // Вестник Башкирского университета. 2014. Т.19(4). С. 1196-1199.
3. 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
4. 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
5. 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
6. Сахабутдинова А.Р., Гарафутдинов Р.Р., Чемерис Д.А., Кулуев А.Р., Кулуев И.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
7. Asari M, Watanabe S, Matsubara K, Shiono H, Shimizu K. Single nucleotide polymorphism genotyping by mini-primer allele-specific amplification with universal reporter primers for identification of degraded DNA. *Anal Biochem.* 2009. V.386(1). P.85-90. doi: 10.1016/j.ab.2008.11.023
8. Bi W., Stambrook P.J. Detection of known mutation by proof-reading PCR // *Nucleic Acids Res.* 1998. V. 26(12). P. 3073-3075. doi: 10.1093/nar/26.12.3073
9. Bottema C.D., Sarkar G., Cassady J.D., Ii S., Dutton C.M., Sommer S.S. Polymerase chain reaction amplification of specific alleles: a general method of detection of mutations, polymorphisms, and haplotypes // *Methods Enzymol.* 1993. V. 218. P. 388-402. doi: 10.1016/0076-6879(93)18031-7
10. Bottema C.D., Sommer S.S. PCR amplification of specific alleles: rapid detection of known mutations and polymorphisms // *Mutat. Res.* 1993. V. 288(1). P. 93-102. doi: 10.1016/0027-5107(93)90211-w.
11. Bui M., Liu Z. Simple allele-discriminating PCR for cost-effective and rapid genotyping and mapping // *Plant Methods.* 2009. V. 5. P. 1. doi: 10.1186/1746-4811-5-1
12. Cahill P., Bakis M., Hurley J., Kamath V., Nielsen W., Weymouth D., Dupuis J., Doucette-Stamm L., Smith D.R. Exo-proofreading, a versatile SNP scoring technology // *Genome Res.* 2003. V. 13(5). P. 925-931. doi: 10.1101/gr.939903
13. Cha R.S., Zarbl H., Keohavong P., Thilly W.G. Mismatch amplification mutation assay (MAMA): application to the c-H-ras gene // *PCR Methods Appl.* 1992. V. 2(1). P. 14-20. doi: 10.1101/gr.2.1.14
14. Cheng J., Zhang Y., Li Q. Real-time PCR genotyping using displacing probes // *Nucleic Acids Res.* 2004. V. 32(7). e61. doi: 10.1093/nar/gnh055
15. Chiapparino E., Lee D., Donini P. Genotyping single nucleotide polymorphisms in barley by tetra-primer ARMS-PCR // *Genome.* 2004. V. 47(2). P. 414-420. doi: 10.1139/g03-130
16. Di Giusto DA, King GC. Strong positional preference in the interaction of LNA oligonucleotides with DNA polymerase and proofreading exonuclease activities: implications for genotyping assays. *Nucleic Acids Res.* 2004. V.32(3). e32. doi: 10.1093/nar/gnh036
17. Dutton C., Sommer S.S. Simultaneous detection of multiple single-base alleles at a polymorphic site // *Biotechniques.* 1991. V. 11(6). P. 700-702.
18. Ehlen T., Dubeau L. Detection of ras point mutations by polymerase chain reaction using mutation-specific, inosine-containing oligonucleotide primers // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989. V. 160(2). P. 441-447. doi: 10.1016/0006-291x(89)92452-2
19. Eitan Y., Kashi Y. Direct micro-haplotyping by multiple double PCR amplifications of specific alleles (MD-PASA) // *Nucleic Acids Res.* 2002. V. 30(12). e62. doi: 10.1093/nar/gnf062
20. Fauser S., Wissinger B. Simultaneous detection of multiple point mutations using fluorescence-coupled competitive primer extension // *Biotechniques.* 1997. V. 22(5). P. 964-968. doi: 10.2144/97225rr05
21. Ferrie R.M., Schwarz M.J., Robertson N.H., Vaudin S., Super M., Malone G., Little S. Development, multiplexing, and application of ARMS tests for common mutations in the CFTR gene // *Am. J. Hum. Genet.* 1992. V. 51(2). P. 251-262.
22. Fortina P., Conant R., Parrella T., Rappaport E., Scanlin T., Schwartz E., Robertson J.M., Surrey S. Fluorescence-based, multiplex allele-specific PCR (MASPCR) detection of the delta F508 deletion in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene // *Mol. Cell. Probes.* 1992. V. 6(4). P. 353-356. doi: 10.1016/0890-8508(92)90013-n
23. Fortina P., Dotti G., Conant R., Monokian G., Parrella T., Hitchcock W., Rappaport E., Schwartz E., Surrey S. Detection of the most common mutations causing beta-thalassemia in Mediterraneans using a multiplex amplification refractory mutation system (MARMS) // *PCR Methods Appl.* 1992a. V. 2(2). P. 163-166. doi: 10.1101/gr.2.2.163
24. Gale JM, Tafoya GB. Evaluation of 15 polymerases and phosphorothioate primer modification for detection of UV-induced C:G to T:A mutations by allele-specific PCR. *Photochem Photobiol.* 2004. V.79(5). P.461-469. doi: 10.1562/2003-11-12-ra.1
25. Gibbs R.A., Nguyen P.N., Caskey C.T. Detection of single DNA base differences by competitive oligonucleotide priming // *Nucleic Acids Res.* 1989. V. 17(7). P. 2437-2448. doi: 10.1093/nar/17.7.2437
26. Gibson N.J., Newton C.R., Little S. A colorimetric assay for phosphate to measure amplicon accumulation in polymerase chain reaction // *Anal. Biochem.* 1997. V. 254(1). P. 18-22. doi: 10.1006/abio.1997.2324
27. Glaab W.E., Skopek T.R. A novel assay for allelic discrimination that combines the fluorogenic 5' nuclease polymerase chain reaction (TaqMan) and

- mismatch amplification mutation assay // *Mutat. Res.* 1999. V. 430(1). P. 1-12. doi: 10.1016/s0027-5107(99)00147-5
28. 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
29. 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
30. Hamajima N. PCR-CTPP: a new genotyping technique in the era of genetic epidemiology // *Expert. Rev. Mol. Diagn.* 2001. V. 1(1). P. 119-123. doi: 10.1586/14737159.1.1.119
31. Hamajima N., Saito T., Matsuo K., Kozaki K., Takahashi T., Tajima K. Polymerase chain reaction with confronting two-pair primers for polymorphism genotyping // *Jpn. J. Cancer Res.* 2000. V. 91(9). P. 865-868. doi: 10.1111/j.1349-7006.2000.tb01026.x
32. Hayashi G., Hagihara M., Kobori A., Nakatani K. Detection of L-DNA-tagged PCR products by surface plasmon resonance imaging // *Chembiochem.* 2007. V. 8(2). P. 169-171. doi: 10.1002/cbic.200600477
33. Hayashi G., Hagihara M., Nakatani K. Genotyping by allele-specific L-DNA-tagged PCR // *J. Biotechnol.* 2008. V. 135(2). P. 157-160. doi: 10.1016/j.jbiotec.2008.03.011
34. He C., Holme J., Anthony J. SNP Genotyping: The KASP Assay // *Methods Mol. Biol.* V.1145.2014. doi: 10.1007/978-1-4939-0446-4\_7
35. Hu Y.J., Li Z.F., Diamond A.M. Enhanced discrimination of single nucleotide polymorphism in genotyping by phosphorothioate proofreading allele-specific amplification // *Anal. Biochem.* 2007. V. 369(1). P. 54-59. doi: 10.1016/j.ab.2007.04.042
36. Huang M.M., Arnheim N., Goodman M.F. Extension of base mispairs by Taq DNA polymerase: implications for single nucleotide discrimination in PCR // *Nucleic Acids Res.* 1992. V. 20(17). P. 4567-4573. doi: 10.1093/nar/20.17.4567
37. Hwang I.T., Kim Y.J., Kim S.H., Kwak C.I., Gu Y.Y., Chun J.Y. Annealing control primer system for improving specificity of PCR amplification // *Biotechniques.* 2003. V. 35(6). P. 1180-1184. doi: 10.2144/03356st03
38. Iliadi A., Petropoulou M., Ioannou PC, Christopoulos TK, Anagnostopoulos NI, Kanavakis E, Traeger-Synodinos J. Absolute quantification of the alleles in somatic point mutations by bioluminometric methods based on competitive polymerase chain reaction in the presence of a locked nucleic acid blocker or an allele-specific primer. *Anal. Chem.* 2011. V.83(17). P.6545-6551. doi: 10.1021/ac200810h
39. Imyanitov E.N., Buslov K.G., Suspitsin E.N., Kuligina E.Sh., Belogubova E.V., Grigoriev M.Y., Togo A.V., Hanson K.P. Improved reliability of allele-specific PCR // *Biotechniques.* 2002. V. 33(3). P. 484, 486, 488 passim. doi: 10.2144/02333bm04
40. Ishiguro A., Kubota T., Soya Y., Sasaki H., Yagyu O., Takarada Y., Iga T. High-throughput detection of multiple genetic polymorphisms influencing drug metabolism with mismatch primers in allele-specific polymerase chain reaction // *Anal. Biochem.* 2005. V. 337(2). P. 256-261. doi: 10.1016/j.ab.2004.11.038  
Erratum in: *Anal. Biochem.* 2005. V. 343(2). P. 359.
41. Jiang S., Tong Y., Zhao R., Xiong G., Qiao B., Li Y. An improved PCR-CTPP assay for the detection of ADH1B Arg48His polymorphism // *J. Clin. Lab. Anal.* 2018. V. 32(2). e22268. doi: 10.1002/jcla.22268
42. Kalendar R, Baidyussen A, Serikbay D, Zotova L, Khassanova G, Kuzbakova M, Jatayev S, Hu YG, Schramm C, Anderson PA, Jenkins CLD, Soole KL, Shavrukov Y. Modified "Allele-Specific qPCR" Method for SNP Genotyping Based on FRET // *Front Plant Sci.* 2022. V.12:747886. doi: 10.3389/fpls.2021.747886
43. Kofiadi I.A., Rebrikov D.V. [Methods for detecting single nucleotide polymorphisms: allele-specific PCR and hybridization with oligonucleotide probe] // *Genetika.* 2006. V. 42(1). P. 22-32. [in Russian].
44. Koizumi M., Morita K., Takagi M., Yasumo H., Kasuya A. Improvement of single nucleotide polymorphism genotyping by allele-specific PCR using primers modified with an ENA residue // *Anal. Biochem.* 2005. V. 340(2). P. 287-294. doi: 10.1016/j.ab.2005.02.029
45. Kwok S., Kellogg D.E., McKinney N., Spasic D., Goda L., Levenson C., Sninsky J.J. Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: human immunodeficiency virus type 1 model studies // *Nucleic Acids Res.* 1990. V. 18(4). P. 999-1005. doi: 10.1093/nar/18.4.999
46. Latorra D., Campbell K., Wolter A., Hurley J.M. Enhanced allele-specific PCR discrimination in SNP genotyping using 3' locked nucleic acid (LNA) primers // *Hum. Mutat.* 2003. V. 22(1). P. 79-85. doi: 10.1002/humu.10228
47. Li C.X., Pan Q., Guo Y.G., Li Y., Gao H.F., Zhang D., Hu H., Xing W.L., Mitchelson K., Xia K., Dai P., Cheng J. Construction of a multiplex allele-specific PCR-based universal array (ASPUA) and its application to hearing loss screening // *Hum. Mutat.* 2008. V. 29(2). P. 306-314. doi: 10.1002/humu.20622
48. Li J, Makrigiorgos GM. Anti-primer quenching-based real-time PCR for simplex or multiplex DNA quantification and single-nucleotide polymorphism genotyping. *Nat Protoc.* 2007. V.2(1). P.50-58. doi:

- 10.1038/nprot.2007.11
49. Li K, Zhang J, Chen L, Sommer SS. Superb nucleotide discrimination by a novel on/off switch for DNA polymerization and its applications. *Mol Biotechnol.* 2005. V.29(2). P.93-100. doi: 10.1385/MB:29:2:093
50. Lin-Ling C., Zhang J., Sommer S.S., Li K. Single-base discrimination mediated by proofreading inert allele specific primers // *J. Biochem. Mol. Biol.* 2005. V.38(1). P.24-27. doi: 10.5483/bmbrep.2005.38.1.024
51. Liu Q, Sommer SS. Detection of extremely rare alleles by bidirectional pyrophosphorolysis-activated polymerization allele-specific amplification (Bi-PAP-A): measurement of mutation load in mammalian tissues // *Biotechniques.* 2004. V.36(1). P.156-166. doi: 10.2144/04361DD03
52. Liu Q, Sommer SS. PAP: detection of ultra rare mutations depends on P\* oligonucleotides: "sleeping beauties" awakened by the kiss of pyrophosphorolysis // *Hum Mutat.* 2004a. V.23(5). P.426-436. doi: 10.1002/humu.20036
53. Liu Q., Thorland E.C., Heit J.A., Sommer S.S. Overlapping PCR for bidirectional PCR amplification of specific alleles: a rapid one-tube method for simultaneously differentiating homozygotes and heterozygotes // *Genome Res.* 1997. V. 7(4). P. 389-398. doi: 10.1101/gr.7.4.389
54. Lo Y.M., Patel P., Newton C.R., Markham A.F., Fleming K.A., Wainscoat J.S. Direct haplotype determination by double ARMS: specificity, sensitivity and genetic applications // *Nucleic Acids Res.* 1991. V. 19(13). P. 3561-3567. doi: 10.1093/nar/19.13.3561
55. McKinzie P.B., Parsons B.L. Detection of rare K-ras codon 12 mutations using allele-specific competitive blocker PCR // *Mutat. Res.* 2002. V. 517(1-2). P. 209-220. doi: 10.1016/s1383-5718(02)00077-3
56. Medintz I., Wong W.W., Sensabaugh G., Mathies R.A. High speed single nucleotide polymorphism typing of a hereditary haemochromatosis mutation with capillary array electrophoresis microplates // *Electrophoresis.* 2000. V. 21(12). P. 2352-2358. doi: 10.1002/1522-2683(20000701)21:12<2352::AID-ELPS2352>3.0.CO;2-G
57. Medrano R.F., de Oliveira C.A. Guidelines for the tetra-primer ARMS-PCR technique development // *Mol. Biotechnol.* 2014. V. 56(7). P. 599-608. doi: 10.1007/s12033-014-9734-4
58. Mesrian Tanha H., Mojtabavi Naeini M., Rahgozar S., Rasa S.M., Vallian S. Modified tetra-primer ARMS PCR as a single-nucleotide polymorphism genotyping tool // *Genet. Test. Mol. Biomarkers.* 2015. V. 19(3). P. 156-161. doi: 10.1089/gtmb.2014.0289
59. Myakishev M.V., Khripin Y., Hu S., Hamer D.H. High-throughput SNP genotyping by allele-specific PCR with universal energy-transfer-labeled primers // *Genome Res.* 2001. V. 11(1). P. 163-169. doi: 10.1101/gr.157901
60. Myers M.B., McKim K.L., Wang Y., Banda M., Parsons B.L. ACB-PCR Quantification of Low-Frequency Hotspot Cancer-Driver Mutations // *Methods Mol. Biol.* 2020. V. 2102. P. 395-417. doi: 10.1007/978-1-0716-0223-2\_23
61. Nakitandwe J, Trognitz F, Trognitz B. Reliable allele detection using SNP-based PCR primers containing Locked Nucleic Acid: application in genetic mapping. *Plant Methods.* 2007. V.3. 2. doi: 10.1186/1746-4811-3-2
62. Nazarenko IA, Bhatnagar SK, Hohman RJ. A closed tube format for amplification and detection of DNA based on energy transfer. *Nucleic Acids Res.* 1997. V.25(12). P.2516-2521. doi: 10.1093/nar/25.12.2516
63. Newton C.R., Graham A., Heptinstall L.E., Powell S.J., Summers C., Kalsheker N., Smith J.C., Markham A.F. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS) // *Nucleic Acids Res.* 1989. V. 17(7). P. 2503-2516. doi: 10.1093/nar/17.7.2503
64. Ochman H, Gerber AS, Hartl DL. Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction // *Genetics.* 1988 V.120(3). P.621-623. doi: 10.1093/genetics/120.3.621
65. Okayama H., Curiel D.T., Brantly M.L., Holmes M.D., Crystal R.G. Rapid, nonradioactive detection of mutations in the human genome by allele-specific amplification // *J Lab Clin Med.* 1989. V.114(2). P.105-113. doi: 10.5555./uri:pii0022214389901078
66. Okimoto R., Dodgson J.B. Improved PCR amplification of multiple specific alleles (PAMSA) using internally mismatched primers // *Biotechniques.* 1996. V. 21(1). P. 20-22, 24, 26. doi: 10.2144/96211bm03
67. Orou A., Fechner B., Utermann G., Menzel H.J. Allele-specific competitive blocker PCR: a one-step method with applicability to pool screening // *Hum. Mutat.* 1995. V. 6(2). P. 163-169. doi: 10.1002/humu.1380060209
68. Parsons B.L., Heflich R.H. Detection of a mouse H-ras codon 61 mutation using a modified allele-specific competitive blocker PCR genotypic selection method // *Mutagenesis.* 1998. V. 13(6). P. 581-588. doi: 10.1093/mutage/13.6.581
69. Parsons BL, McKinzie PB, Heflich RH. Allele-specific competitive blocker-PCR detection of rare base substitution // *Methods Mol. Biol.* 2005. V. 291. P. 235-245. doi: 10.1385/1-59259-840-4:235
70. Peruzzi B., Serra M., Pescucci C., Sica M., Lastraioli S., Rondelli T., Pedemonte S., Risitano A.M., De Angioletti M., Piccioli P., Notaro R. Easy genotyping of complement C3 'slow' and 'fast' allotypes by tetra-primer amplification refractory mutation system PCR // *Mol. Cell. Probes.* 2010. V. 24(6). P. 401-402. doi: 10.1016/j.mcp.2010.07.002
71. Petruska J., Goodman M.F., Boosalis M.S., Sowers L.C., Cheong C., Tinoco I.Jr. Comparison

- between DNA melting thermodynamics and DNA polymerase fidelity // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85(17). P. 6252-6256. doi: 10.1073/pnas.85.17.6252
72. Piccioli P., Serra M., Pedemonte S., Balbi G., Loiacono F., Lastraioli S., Gargiulo L., Morabito A., Zuccaro D., Del Mastro L., Pistillo M.P., Venturini M., De Angioletti M., Notaro R. Hexaprimer amplification refractory mutation system PCR for simultaneous single-tube genotyping of 2 close polymorphisms // Clin. Chem. 2008. V. 54(1). P. 227-229. doi: 10.1373/clinchem.2007.095703
73. Rasheed A, Wen W, Gao F, Zhai S, Jin H, Liu J, Guo Q, Zhang Y, Dreisigacker S, Xia X, He Z. Development and validation of KASP assays for genes underpinning key economic traits in bread wheat. Theor Appl Genet. 2016. V.129(10). P.1843-1860. doi: 10.1007/s00122-016-2743-x
74. Roncallo PF, Beaufort V, Larsen AO, Dreisigacker S, Echenique V. Genetic diversity and linkage disequilibrium using SNP (KASP) and AFLP markers in a worldwide durum wheat (*Triticum turgidum* L. var durum) collection. PLoS One. 2019. V.14(6). e0218562. doi: 10.1371/journal.pone.0218562
75. Ruano G., Kidd K.K. Direct haplotyping of chromosomal segments from multiple heterozygotes via allele-specific PCR amplification // Nucleic Acids Res. 1989. V. 17(20). P. 8392. doi: 10.1093/nar/17.20.8392
76. Rupp J, Solbach W, Gieffers J. Single-nucleotide-polymorphism-specific PCR for quantification and discrimination of *Chlamydia pneumoniae* genotypes by use of a "locked" nucleic acid. Appl Environ Microbiol. 2006. V.72(5). P.3785-3787. doi: 10.1128/AEM.72.5.3785-3787.2006
77. Rust S., Funke H., Assmann G. Mutagenically separated PCR (MS-PCR): a highly specific one step procedure for easy mutation detection // Nucleic Acids Res. 1993. V. 21(16). P. 3623-3629. doi: 10.1093/nar/21.16.3623
78. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988. V.239(4839). P.487-491. DOI: 10.1126/science.239.4839.487
79. Sarkar G., Cassady J., Bottema C.D., Sommer S.S. Characterization of polymerase chain reaction amplification of specific alleles // Anal. Biochem. 1990. V. 186(1). P. 64-68. doi: 10.1016/0003-2697(90)90573-r
80. Sarkar G., Sommer S.S. Haplotyping by double PCR amplification of specific alleles // Biotechniques. 1991. V. 10(4). P. 436, 438, 440.
81. Sasvari-Szekely M., Gerstner A., Ronai Z., Staub M., Guttman A. Rapid genotyping of factor V Leiden mutation using single-tube bidirectional allele-specific amplification and automated ultrathin-layer agarose gel electrophoresis // Electrophoresis. 2000. V. 21(4). P. 816-821. doi: 10.1002/(SICI)1522-2683(20000301)21:4<816::AID-ELPS816>3.0.CO;2-Y
82. Semagn K., Babu R., Hearne S.Olsen M. Single nucleotide polymorphism genotyping using Kompetitive Allele Specific PCR (KASP): overview of the technology and its application in crop improvement // Mol. Breeding. 2014. V. 33. P. 1-14. doi: 10.1007/s11032-013-9917-x
83. Seyama T., Ito T., Hayashi T., Mizuno T., Nakamura N., Akiyama M. A novel blocker-PCR method for detection of rare mutant alleles in the presence of an excess amount of normal DNA // Nucleic Acids Res. 1992. V. 20(10). P. 2493-2496. doi: 10.1093/nar/20.10.2493
84. Sinha P, Banerjee T, Srivastava GN, Anupurba S. Rapid detection of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* directly from clinical specimens using allele-specific polymerase chain reaction assay // Indian J Med Res. 2019. V.150(1). P.33-42. doi: 10.4103/ijmr.IJMR\_374\_18
85. Smith S.M., Maughan P.J. SNP genotyping using KASPar assays // Methods Mol. Biol. 2015. V. 1245. P. 243-256. doi: 10.1007/978-1-4939-1966-6\_18
86. Sommer S.S., Cassady J.D., Sobell J.L., Bottema C.D. A novel method for detecting point mutations or polymorphisms and its application to population screening for carriers of phenylketonuria // Mayo Clin. Proc. 1989. V. 64(11). P. 1361-1372. doi: 10.1016/s0025-6196(12)65378-6
87. Sommer S.S., Groszbach A.R., Bottema C.D. PCR amplification of specific alleles (PASA) is a general method for rapidly detecting known single-base changes // Biotechniques. 1992. V. 12(1). P. 82-87.
88. Takeda S., Ichii S., Nakamura Y. Detection of K-ras mutation in sputum by mutant-allele-specific amplification (MASA) // Hum. Mutat. 1993. V. 2(2). P. 112-117. doi: 10.1002/humu.1380020209
89. Takei F, Igarashi M, Oka Y, Koga Y, Nakatani K. Competitive allele-specific hairpin primer PCR for extremely high allele discrimination in typing of single nucleotide polymorphisms. *Chembiochem*. 2012. V.13(10). P.1409-1412. doi: 10.1002/cbic.201200266
90. Triglia T, Peterson MG, Kemp DJ. A procedure for in vitro amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences // Nucleic Acids Res. 1988. V.16(16). P.8186. doi: 10.1093/nar/16.16.8186
91. Wang H., Jiang J., Mostert B., Siewewerts A., Martens J.W., Sleijfer S., Foekens J.A., Wang Y. Allele-specific, non-extendable primer blocker PCR (AS-NEPB-PCR) for DNA mutation detection in cancer // J. Mol. Diagn. 2013. V. 15(1). P. 62-69. doi: 10.1016/j.jmoldx.2012.08.007
92. Watanabe G., Umetsu K., Yuasa I., Sato M., Sakabe M., Naito E., Yamanouchi H., Suzuki T. A novel

- technique for detecting single nucleotide polymorphisms by analyzing consumed allele-specific primers // *Electrophoresis*. 2001. V. 22(3). P. 418-420. doi: 10.1002/1522-2683(200102)22:3<418::AID-ELPS418>3.0.CO;2-8
93. Waterfall C.M., Cobb B.D. Single tube genotyping of sickle cell anaemia using PCR-based SNP analysis // *Nucleic Acids Res.* 2001. V. 29(23). e119. doi: 10.1093/nar/29.23.e119
94. Wegmüller B, Lüthy J, Candrian U. 3'-5' proofreading-induced detection of point mutations by PCR using Tli DNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* 1995. V.23(2). P.311-312. doi: 10.1093/nar/23.2.311
95. Wu D.Y., Ugozzoli L., Pal B.K., Wallace R.B. Allele-specific enzymatic amplification of beta-globin genomic DNA for diagnosis of sickle cell anemia // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989. V. 86(8). P. 2757-2760. doi: 10.1073/pnas.86.8.2757
96. Xiong H, Li Y, Guo H, Xie Y, Zhao L, Gu J, Zhao S, Ding Y, Liu L. Genetic Mapping by Integration of 55K SNP Array and KASP Markers Reveals Candidate Genes for Important Agronomic Traits in Hexaploid Wheat. *Front Plant Sci.* 2021. V.12. 628478. doi: 10.3389/fpls.2021.628478
97. Yang HL, Jiang HJ, Fang WY, Xu YY, Liao DF, He FC. High fidelity PCR with an off/on switch mediated by proofreading polymerases combining with phosphorothioate-modified primer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005. V.328(1). P.265-272. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.12.159
98. Yang L, Zhao D, Meng Z, Xu K, Yan J, Xia X, Cao S, Tian Y, He Z, Zhang Y. QTL mapping for grain yield-related traits in bread wheat via SNP-based selective genotyping. *Theor Appl Genet.* 2020. V.133(3). P.857-872. doi: 10.1007/s00122-019-03511-0
99. Yang S., Shi H., Zhang Z., Chen Z., Yang W., Zhu W. Detection of Tri-allelic Single Nucleotide Polymorphisms of ABCB1 and CRP Genes by Penta-Primer Amplification Refractory Mutation System-Polymerase Chain Reaction // *Genet. Test. Mol. Biomarkers.* 2022. V. 26(1). P. 43-48. doi: 10.1089/gtmb.2021.0145
100. Ye S., Dhillon S., Ke X., Collins A.R., Day I.N. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms // *Nucleic Acids Res.* 2001. V. 29(17). E88-8. doi: 10.1093/nar/29.17.e88
101. Ye S., Humphries S., Green F. Allele specific amplification by tetra-primer PCR // *Nucleic Acids Res.* 1992. V. 20(5). P. 1152. doi: 10.1093/nar/20.5.1152
102. Yin G., Mitsuda Y., Ezaki T., Hamajima N. A new PCR method: one primer amplification of PCR-CTPP products // *Mol. Biotechnol.* 2012. V. 52(2). P. 180-183. doi: 10.1007/s12033-011-9485-4
103. Zetterquist H, Olerup O. Identification of the HLA-DRB1\*04, -DRB1\*07, and -DRB1\*09 alleles by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours. *Hum Immunol.* 1992. V.34(1). P.64-74. doi: 10.1016/0198-8859(92)90086-3
104. Zhang J., Li K. Single-base discrimination mediated by proofreading 3' phosphorothioate-modified primers // *Mol. Biotechnol.* 2003. V. 25(3). P. 223-228. doi: 10.1385/MB:25:3:223
105. Zhang J., Li K. The 3' terminal labeled primer extension: A new method of high throughput screening for SNP analysis. *Current Drug Discov.* 2001. V.9. P.21-24. (cited upon Zhang J., Li K., Pardinias J.R., Sommer S.S., Yao K.T. Proofreading genotyping assays mediated by high fidelity exo+ DNA polymerases. *Trends Biotechnol.* 2005. V. 23(2). P. 92-96. doi: 10.1016/j.tibtech.2004.12.009
106. Zhang J., Li K., Liao D., Pardinias J.R., Chen L., Zhang X. Different applications of polymerases with and without proofreading activity in single-nucleotide polymorphism analysis // *Lab. Invest.* 2003. V. 83(8). P. 1147-1154. doi: 10.1097/01.lab.0000081589.91390.df
107. Zhang J, Li K, Pardinias JR, Liao DF, Li HJ, Zhang X. SNP discrimination through proofreading and OFF-switch of exo+ polymerase. *Mol Biotechnol.* 2004. V.27(1). P.75-80. doi: 10.1385/MB:27:1:75
108. Zhang J., Li K., Pardinias J.R., Sommer S.S., Yao K.T. Proofreading genotyping assays mediated by high fidelity exo+ DNA polymerases // *Trends Biotechnol.* 2005. V. 23(2). P. 92-96. doi: 10.1016/j.tibtech.2004.12.009
109. Zhu K.Y., Clark J.M. Addition of a competitive primer can dramatically improve the specificity of PCR amplification of specific alleles // *Biotechniques.* 1996. V. 21(4). P. 586, 590. doi: 10.2144/96214bm04
110. Zhu S., Fushimi H., Cai S., Komatsu K. Species identification from Ginseng drugs by multiplex amplification refractory mutation system (MARMS) // *Planta Med.* 2004. V. 70(2). P. 189-192. doi: 10.1055/s-2004-815502

## References

- Asari M, Watanabe S, Matsubara K, Shiono H, Shimizu K. Single nucleotide polymorphism genotyping by mini-primer allele-specific amplification with universal reporter primers for identification of degraded DNA. *Anal Biochem.* 2009. V.386(1). P.85-90. doi: 10.1016/j.ab.2008.11.023
- Brenner E.V., Ivanova E.M., Pyshtny D.V., Morozov I.V. Universal method for identification of single nucleotide substitutions // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2005. V. 31(2) P. 213-215.
- Bi W., Stambrook P.J. Detection of known mutation by proof-reading PCR. *Nucleic Acids Res.* 1998. V. 26(12). P. 3073-3075. doi: 10.1093/nar/26.12.3073
- Bottema C.D., Sarkar G., Cassady J.D., Ii S., Dutton C.M., Sommer S.S. Polymerase chain reaction

- amplification of specific alleles: a general method of detection of mutations, polymorphisms, and haplotypes. *Methods Enzymol.* 1993. V. 218. P. 388-402. doi: 10.1016/0076-6879(93)18031-7
5. Bottema C.D., Sommer S.S. PCR amplification of specific alleles: rapid detection of known mutations and polymorphisms. *Mutat. Res.* 1993. V. 288(1). P. 93-102. doi: 10.1016/0027-5107(93)90211-w
  6. Bui M., Liu Z. Simple allele-discriminating PCR for cost-effective and rapid genotyping and mapping. *Plant Methods.* 2009. V. 5. P. 1. doi: 10.1186/1746-4811-5-1
  7. Cahill P., Bakis M., Hurley J., Kamath V., Nielsen W., Weymouth D., Dupuis J., Doucette-Stamm L., Smith D.R. Exo-proofreading, a versatile SNP scoring technology. *Genome Res.* 2003. V. 13(5). P. 925-931. doi: 10.1101/gr.939903
  8. Cha R.S., Zarbl H., Keohavong P., Thilly W.G. Mismatch amplification mutation assay (MAMA): application to the c-H-ras gene. *PCR Methods Appl.* 1992. V. 2(1). P. 14-20. doi: 10.1101/gr.2.1.14
  9. Cheng J., Zhang Y., Li Q. Real-time PCR genotyping using displacing probes. *Nucleic Acids Res.* 2004. V. 32(7). e61. doi: 10.1093/nar/gnh055
  10. Chiapparino E., Lee D., Donini P. Genotyping single nucleotide polymorphisms in barley by tetra-primer ARMS-PCR. *Genome.* 2004. V. 47(2). P. 414-420. doi: 10.1139/g03-130
  11. Di Giusto DA, King GC. Strong positional preference in the interaction of LNA oligonucleotides with DNA polymerase and proofreading exonuclease activities: implications for genotyping assays. *Nucleic Acids Res.* 2004. V.32(3). e32. doi: 10.1093/nar/gnh036
  12. Dutton C., Sommer S.S. Simultaneous detection of multiple single-base alleles at a polymorphic site. *Biotechniques.* 1991. V. 11(6). P. 700-702.
  13. Ehlen T., Dubeau L. Detection of ras point mutations by polymerase chain reaction using mutation-specific, inosine-containing oligonucleotide primers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989. V. 160(2). P. 441-447. doi: 10.1016/0006-291x(89)92452-2
  14. Eitan Y., Kashi Y. Direct micro-haplotyping by multiple double PCR amplifications of specific alleles (MD-PASA). *Nucleic Acids Res.* 2002. V. 30(12). e62. doi: 10.1093/nar/gnf062
  15. Fauser S., Wissinger B. Simultaneous detection of multiple point mutations using fluorescence-coupled competitive primer extension. *Biotechniques.* 1997. V. 22(5). P. 964-968. doi: 10.2144/97225rr05
  16. Ferrie R.M., Schwarz M.J., Robertson N.H., Vaudin S., Super M., Malone G., Little S. Development, multiplexing, and application of ARMS tests for common mutations in the CFTR gene. *Am. J. Hum. Genet.* 1992. V. 51(2). P. 251-262
  17. Fortina P., Conant R., Parrella T., Rappaport E., Scanlin T., Schwartz E., Robertson J.M., Surrey S. Fluorescence-based, multiplex allele-specific PCR (MASPCR) detection of the delta F508 deletion in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *Mol. Cell. Probes.* 1992. V. 6(4). P. 353-356. doi: 10.1016/0890-8508(92)90013-n
  18. Fortina P., Dotti G., Conant R., Monokian G., Parrella T., Hitchcock W., Rappaport E., Schwartz E., Surrey S. Detection of the most common mutations causing beta-thalassemia in Mediterraneans using a multiplex amplification refractory mutation system (MARMS). *PCR Methods Appl.* 1992a. V. 2(2). P. 163-166. doi: 10.1101/gr.2.2.163
  19. Gale JM, Tafoya GB. Evaluation of 15 polymerases and phosphorothioate primer modification for detection of UV-induced C:G to T:A mutations by allele-specific PCR. *Photochem Photobiol.* 2004. V.79(5). P.461-469. doi: 10.1562/2003-11-12-ra.1
  20. Galimova A.A., Garafutdinov R.R., Sakhabutdinova A.R., Chemeris A.V. Allel-spezificheskaja polimeraznaja cepnaja reakcija s ispol'zovaniem sistemy sblizhennyh prajmerov // Vestnik Bashkirskogo universiteta. 2014. V.19(4). S. 1196-1199. [Allele-specific polymerase chain reaction using a system of converged primers] (In Russian)
  21. 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)
  22. 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)
  23. 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)
  24. Gibbs R.A., Nguyen P.N., Caskey C.T. Detection of single DNA base differences by competitive oligonucleotide priming. *Nucleic Acids Res.* 1989. V. 17(7). P. 2437-2448. doi: 10.1093/nar/17.7.2437
  25. Gibson N.J., Newton C.R., Little S. A colorimetric assay for phosphate to measure amplicon accumulation in polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* 1997. V. 254(1). P. 18-22. doi: 10.1006/abio.1997.2324
  26. Glaab W.E., Skopek T.R. A novel assay for allelic discrimination that combines the fluorogenic 5'

- nuclease polymerase chain reaction (TaqMan) and mismatch amplification mutation assay. *Mutat. Res.* 1999. V. 430(1). P. 1-12. doi: 10.1016/s0027-5107(99)00147-5
27. 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
28. 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
29. Hamajima N. PCR-CTPP: a new genotyping technique in the era of genetic epidemiology. *Expert. Rev. Mol. Diagn.* 2001. V. 1(1). P. 119-123. doi: 10.1586/14737159.1.1.119
30. Hamajima N., Saito T., Matsuo K., Kozaki K., Takahashi T., Tajima K. Polymerase chain reaction with confronting two-pair primers for polymorphism genotyping. *Jpn. J. Cancer Res.* 2000. V. 91(9). P. 865-868. doi: 10.1111/j.1349-7006.2000.tb01026.x
31. Hayashi G., Hagihara M., Kobori A., Nakatani K. Detection of L-DNA-tagged PCR products by surface plasmon resonance imaging. *ChemBiochem.* 2007. V. 8(2). P. 169-171. doi: 10.1002/cbic.200600477
32. Hayashi G., Hagihara M., Nakatani K. Genotyping by allele-specific L-DNA-tagged PCR. *J. Biotechnol.* 2008. V. 135(2). P. 157-160. doi: 10.1016/j.jbiotec.2008.03.011
33. He C., Holme J., Anthony J. SNP Genotyping: The KASP Assay. *Methods Mol. Biol.* V.1145.2014. doi: 10.1007/978-1-4939-0446-4\_7
34. Hu Y.J., Li Z.F., Diamond A.M. Enhanced discrimination of single nucleotide polymorphism in genotyping by phosphorothioate proofreading allele-specific amplification. *Anal. Biochem.* 2007. V. 369(1). P. 54-59. doi: 10.1016/j.ab.2007.04.042
35. Huang M.M., Arnheim N., Goodman M.F. Extension of base mispairs by Taq DNA polymerase: implications for single nucleotide discrimination in PCR. *Nucleic Acids Res.* 1992. V. 20(17). P. 4567-4573. doi: 10.1093/nar/20.17.4567
36. Hwang I.T., Kim Y.J., Kim S.H., Kwak C.I., Gu Y.Y., Chun J.Y. Annealing control primer system for improving specificity of PCR amplification. *Biotechniques.* 2003. V. 35(6). P. 1180-1184. doi: 10.2144/03356st03
37. Iliadi A., Petropoulou M., Ioannou PC, Christopoulos TK, Anagnostopoulos NI, Kanavakis E, Traeger-Synodinos J. Absolute quantification of the alleles in somatic point mutations by bioluminometric methods based on competitive polymerase chain reaction in the presence of a locked nucleic acid blocker or an allele-specific primer. *Anal. Chem.* 2011. V.83(17). P.6545-6551. doi: 10.1021/ac200810h
38. Imyanitov E.N., Buslov K.G., Suspitsin E.N., Kuligina E.Sh., Belogubova E.V., Grigoriev M.Y., Togo A.V., Hanson K.P. Improved reliability of allele-specific PCR. *Biotechniques.* 2002. V. 33(3). P. 484, 486, 488 passim. doi: 10.2144/02333bm04
39. Ishiguro A., Kubota T., Soya Y., Sasaki H., Yagyu O., Takarada Y., Iga T. High-throughput detection of multiple genetic polymorphisms influencing drug metabolism with mismatch primers in allele-specific polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* 2005. V. 337(2). P. 256-261. doi: 10.1016/j.ab.2004.11.038  
Erratum in: *Anal. Biochem.* 2005. V. 343(2). P. 359.
40. Jiang S., Tong Y., Zhao R., Xiong G., Qiao B., Li Y. An improved PCR-CTPP assay for the detection of ADH1B Arg48His polymorphism. *J. Clin. Lab. Anal.* 2018. V. 32(2). e22268. doi: 10.1002/jcla.22268
41. Kalendar R, Baidyussen A, Serikbay D, Zotova L, Khassanova G, Kuzbakova M, Jatayev S, Hu YG, Schramm C, Anderson PA, Jenkins CLD, Soole KL, Shavrukov Y. Modified "Allele-Specific qPCR" Method for SNP Genotyping Based on FRET // *Front Plant Sci.* 2022. V.12:747886. doi: 10.3389/fpls.2021.747886
42. Kofiadi I.A., Rebrikov D.V. [Methods for detecting single nucleotide polymorphisms: allele-specific PCR and hybridization with oligonucleotide probe]. *Genetika.* 2006. V. 42(1). P. 22-32. [in Russian].
43. Koizumi M., Morita K., Takagi M., Yasumo H., Kasuya A. Improvement of single nucleotide polymorphism genotyping by allele-specific PCR using primers modified with an ENA residue. *Anal. Biochem.* 2005. V. 340(2). P. 287-294. doi: 10.1016/j.ab.2005.02.029
44. Kwok S., Kellogg D.E., McKinney N., Spasic D., Goda L., Levenson C., Sninsky J.J. Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: human immunodeficiency virus type 1 model studies. *Nucleic Acids Res.* 1990. V. 18(4). P. 999-1005. doi: 10.1093/nar/18.4.999
45. Latorra D., Campbell K., Wolter A., Hurley J.M. Enhanced allele-specific PCR discrimination in SNP genotyping using 3' locked nucleic acid (LNA) primers. *Hum. Mutat.* 2003. V. 22(1). P. 79-85. doi: 10.1002/humu.10228
46. Li C.X., Pan Q., Guo Y.G., Li Y., Gao H.F., Zhang D., Hu H., Xing W.L., Mitchelson K., Xia K., Dai P., Cheng J. Construction of a multiplex allele-specific PCR-based universal array (ASPUA) and its application to hearing loss screening. *Hum. Mutat.* 2008. V. 29(2). P. 306-314. doi: 10.1002/humu.20622
47. Li K, Zhang J, Chen L, Sommer SS. Superb nucleotide discrimination by a novel on/off switch for DNA polymerization and its applications. *Mol*

- Biotechnol. 2005. V.29(2). P.93-100. doi: 10.1385/MB:29:2:093
48. Li J, Makrigiorgos GM. Anti-primer quenching-based real-time PCR for simplex or multiplex DNA quantification and single-nucleotide polymorphism genotyping. *Nat Protoc.* 2007. V.2(1). P.50-58. doi: 10.1038/nprot.2007.11
49. Lin-Ling C., Zhang J., Sommer S.S., Li K. Single-base discrimination mediated by proofreading inert allele specific primers. *J. Biochem. Mol. Biol.* 2005.V. 38(1). P. 24-27. doi: 10.5483/bmbrep.2005.38.1.024
50. Liu Q, Sommer SS. Detection of extremely rare alleles by bidirectional pyrophosphorolysis-activated polymerization allele-specific amplification (Bi-PAP-A): measurement of mutation load in mammalian tissues // *Biotechniques.* 2004. V.36(1). P.156-166. doi: 10.2144/04361DD03
51. Liu Q, Sommer SS. PAP: detection of ultra rare mutations depends on P\* oligonucleotides: "sleeping beauties" awakened by the kiss of pyrophosphorolysis // *Hum Mutat.* 2004. V.23(5). P.426-436. doi: 10.1002/humu.20036
52. Liu Q., Thorland E.C., Heit J.A., Sommer S.S. Overlapping PCR for bidirectional PCR amplification of specific alleles: a rapid one-tube method for simultaneously differentiating homozygotes and heterozygotes. *Genome Res.* 1997. V. 7(4). P. 389-398. doi: 10.1101/gr.7.4.389
53. Lo Y.M., Patel P., Newton C.R., Markham A.F., Fleming K.A., Wainscoat J.S. Direct haplotype determination by double ARMS: specificity, sensitivity and genetic applications. *Nucleic Acids Res.* 1991. V. 19(13). P. 3561-3567. doi: 10.1093/nar/19.13.3561
54. McKinzie P.B., Parsons B.L. Detection of rare K-ras codon 12 mutations using allele-specific competitive blocker PCR. *Mutat. Res.* 2002. V. 517(1-2). P. 209-220. doi: 10.1016/s1383-5718(02)00077-3
55. Medintz I., Wong W.W., Sensabaugh G., Mathies R.A. High speed single nucleotide polymorphism typing of a hereditary haemochromatosis mutation with capillary array electrophoresis microplates. *Electrophoresis.* 2000. V. 21(12). P. 2352-2358. doi: 10.1002/1522-2683(20000701)21:12<2352::AID-ELPS2352>3.0.CO;2-G
56. Medrano R.F., de Oliveira C.A. Guidelines for the tetra-primer ARMS-PCR technique development. *Mol. Biotechnol.* 2014. V. 56(7). P. 599-608. doi: 10.1007/s12033-014-9734-4
57. Mesrian Tanha H., Mojtabavi Naeini M., Rahgozar S., Rasa S.M., Vallian S. Modified tetra-primer ARMS PCR as a single-nucleotide polymorphism genotyping tool. *Genet. Test. Mol. Biomarkers.* 2015. V. 19(3). P. 156-161. doi: 10.1089/gtmb.2014.0289
58. Myakishev M.V., Khripin Y., Hu S., Hamer D.H. High-throughput SNP genotyping by allele-specific PCR with universal energy-transfer-labeled primers. *Genome Res.* 2001. V. 11(1). P. 163-169. doi: 10.1101/gr.157901
59. Myers M.B., McKim K.L., Wang Y., Banda M., Parsons B.L. ACB-PCR Quantification of Low-Frequency Hotspot Cancer-Driver Mutations. *Methods Mol. Biol.* 2020. V. 2102. P. 395-417. doi: 10.1007/978-1-0716-0223-2\_23
60. Nakitandwe J, Trognitz F, Trognitz B. Reliable allele detection using SNP-based PCR primers containing Locked Nucleic Acid: application in genetic mapping. *Plant Methods.* 2007. V.3. 2. doi: 10.1186/1746-4811-3-2
61. Nazarenko IA, Bhatnagar SK, Hohman RJ. A closed tube format for amplification and detection of DNA based on energy transfer. *Nucleic Acids Res.* 1997. V.25(12). P.2516-2521. doi: 10.1093/nar/25.12.2516
62. Newton C.R., Graham A., Heptinstall L.E., Powell S.J., Summers C., Kalsheker N., Smith J.C., Markham A.F. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res.* 1989. V. 17(7). P. 2503-2516. doi: 10.1093/nar/17.7.2503
63. Ochman H, Gerber AS, Hartl DL. Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction // *Genetics.* 1988 V.120(3). P.621-623. doi: 10.1093/genetics/120.3.621
64. Okayama H., Curiel D.T., Brantly M.L., Holmes M.D., Crystal R.G. Rapid, nonradioactive detection of mutations in the human genome by allele-specific amplification // *J Lab Clin Med.* 1989. V.114(2). P.105-113. doi: 10.5555/uri:pii0022214389901078
65. Okimoto R., Dodgson J.B. Improved PCR amplification of multiple specific alleles (PAMSA) using internally mismatched primers. *Biotechniques.* 1996. V. 21(1). P. 20-22, 24, 26. doi: 10.2144/96211bm03
66. Orou A., Fechner B., Utermann G., Menzel H.J. Allele-specific competitive blocker PCR: a one-step method with applicability to pool screening. *Hum. Mutat.* 1995. V. 6(2). P. 163-169. doi: 10.1002/humu.1380060209
67. Parsons B.L., Heflich R.H. Detection of a mouse H-ras codon 61 mutation using a modified allele-specific competitive blocker PCR genotypic selection method. *Mutagenesis.* 1998. V. 13(6). P. 581-588. doi: 10.1093/mutage/13.6.581
68. Parsons BL, McKinzie PB, Heflich RH. Allele-specific competitive blocker-PCR detection of rare base substitution. *Methods Mol. Biol.* 2005. V. 291. P. 235-245. doi: 10.1385/1-59259-840-4:235
69. Peruzzi B., Serra M., Pescucci C., Sica M., Lastraioli S., Rondelli T., Pedemonte S., Risitano A.M., De Angioletti M., Piccioli P., Notaro R. Easy genotyping of complement C3 'slow' and 'fast' allotypes by tetra-primer amplification refractory mutation system PCR. *Mol. Cell. Probes.* 2010. V. 24(6). P. 401-402. doi: 10.1016/j.mcp.2010.07.002

70. Petruska J., Goodman M.F., Boosalis M.S., Sowers L.C., Cheong C., Tinoco I.Jr. Comparison between DNA melting thermodynamics and DNA polymerase fidelity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1988. V. 85(17). P. 6252-6256. doi: 10.1073/pnas.85.17.6252
71. Piccioli P., Serra M., Pedemonte S., Balbi G., Loiacono F., Lastraioli S., Gargiulo L., Morabito A., Zuccaro D., Del Mastro L., Pistillo M.P., Venturini M., De Angioletti M., Notaro R. Hexaprimer amplification refractory mutation system PCR for simultaneous single-tube genotyping of 2 close polymorphisms. *Clin. Chem*. 2008. V. 54(1). P. 227-229. doi: 10.1373/clinchem.2007.095703
72. Rasheed A, Wen W, Gao F, Zhai S, Jin H, Liu J, Guo Q, Zhang Y, Dreisigacker S, Xia X, He Z. Development and validation of KASP assays for genes underpinning key economic traits in bread wheat. *Theor Appl Genet*. 2016. V.129(10). P.1843-1860. doi: 10.1007/s00122-016-2743-x
73. Roncallo PF, Beaufort V, Larsen AO, Dreisigacker S, Echenique V. Genetic diversity and linkage disequilibrium using SNP (KASP) and AFLP markers in a worldwide durum wheat (*Triticum turgidum* L. var durum) collection. *PLoS One*. 2019. V.14(6). e0218562. doi: 10.1371/journal.pone.0218562
74. Ruano G., Kidd K.K. Direct haplotyping of chromosomal segments from multiple heterozygotes via allele-specific PCR amplification. *Nucleic Acids Res*. 1989. V. 17(20). P. 8392. doi: 10.1093/nar/17.20.8392
75. Rupp J, Solbach W, Gieffers J. Single-nucleotide-polymorphism-specific PCR for quantification and discrimination of *Chlamydia pneumoniae* genotypes by use of a "locked" nucleic acid. *Appl Environ Microbiol*. 2006. V.72(5). P.3785-3787. doi: 10.1128/AEM.72.5.3785-3787.2006
76. Rust S., Funke H., Assmann G. Mutagenically separated PCR (MS-PCR): a highly specific one step procedure for easy mutation detection. *Nucleic Acids Res*. 1993. V. 21(16). P. 3623-3629. doi: 10.1093/nar/21.16.3623
77. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988. V.239(4839). P.487-491. DOI: 10.1126/science.239.4839.487
78. 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. *Biomcs*. 2021. V.13(4). P.444-456. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2021-31 (In Russian)
79. Sarkar G., Cassady J., Bottema C.D., Sommer S.S. Characterization of polymerase chain reaction amplification of specific alleles. *Anal. Biochem*. 1990. V. 186(1). P. 64-68. doi: 10.1016/0003-2697(90)90573-r
80. Sarkar G., Sommer S.S. Haplotyping by double PCR amplification of specific alleles. *Biotechniques*. 1991. V. 10(4). P. 436, 438, 440.
81. Sasvari-Szekely M., Gerstner A., Ronai Z., Staub M., Guttman A. Rapid genotyping of factor V Leiden mutation using single-tube bidirectional allele-specific amplification and automated ultrathin-layer agarose gel electrophoresis. *Electrophoresis*. 2000. V. 21(4). P. 816-821. doi: 10.1002/(SICI)1522-2683(20000301)21:4<816::AID-ELPS816>3.0.CO;2-Y
82. Semagn K., Babu R., Hearne S.Olsen M. Single nucleotide polymorphism genotyping using Kompetitive Allele Specific PCR (KASP): overview of the technology and its application in crop improvement. *Mol. Breeding*. 2014. V. 33. P. 1-14. doi: 10.1007/s11032-013-9917-x
83. Seyama T., Ito T., Hayashi T., Mizuno T., Nakamura N., Akiyama M. A novel blocker-PCR method for detection of rare mutant alleles in the presence of an excess amount of normal DNA. *Nucleic Acids Res*. 1992. V. 20(10). P. 2493-2496. doi: 10.1093/nar/20.10.2493
84. Sinha P, Banerjee T, Srivastava GN, Anupurba S. Rapid detection of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* directly from clinical specimens using allele-specific polymerase chain reaction assay // *Indian J Med Res*. 2019. V.150(1). P.33-42. doi: 10.4103/ijmr.IJMR\_374\_18
85. Smith S.M., Maughan P.J. SNP genotyping using KASPar assays. *Methods Mol. Biol*. 2015. V. 1245. P. 243-256. doi: 10.1007/978-1-4939-1966-6\_18
86. Sommer S.S., Cassady J.D., Sobell J.L., Bottema C.D. A novel method for detecting point mutations or polymorphisms and its application to population screening for carriers of phenylketonuria. *Mayo Clin. Proc*. 1989. V. 64(11). P. 1361-1372. doi: 10.1016/s0025-6196(12)65378-6
87. Sommer S.S., Groszbach A.R., Bottema C.D. PCR amplification of specific alleles (PASA) is a general method for rapidly detecting known single-base changes. *Biotechniques*. 1992. V. 12(1). P. 82-87.
88. Takeda S., Ichii S., Nakamura Y. Detection of K-ras mutation in sputum by mutant-allele-specific amplification (MASA). *Hum. Mutat*. 1993. V. 2(2). P. 112-117. doi: 10.1002/humu.1380020209
89. Takei F, Igarashi M, Oka Y, Koga Y, Nakatani K. Competitive allele-specific hairpin primer PCR for extremely high allele discrimination in typing of single nucleotide polymorphisms. *Chembiochem*. 2012. V.13(10). P.1409-1412. doi: 10.1002/cbic.201200266
90. Triglia T, Peterson MG, Kemp DJ. A procedure for in vitro amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences // *Nucleic*

- Acids Res. 1988. V.16(16). P.8186. doi: 10.1093/nar/16.16.8186
91. Wang H., Jiang J., Mostert B., Sieuwerts A., Martens J.W., Sleijfer S., Foekens J.A., Wang Y. Allele-specific, non-extendable primer blocker PCR (AS-NEPB-PCR) for DNA mutation detection in cancer. *J. Mol. Diagn.* 2013. V. 15(1). P. 62-69. doi: 10.1016/j.jmoldx.2012.08.007
92. Watanabe G., Umetsu K., Yuasa I., Sato M., Sakabe M., Naito E., Yamanouchi H., Suzuki T. A novel technique for detecting single nucleotide polymorphisms by analyzing consumed allele-specific primers. *Electrophoresis.* 2001. V. 22(3). P. 418-420. doi: 10.1002/1522-2683(200102)22:3<418::AID-ELPS418>3.0.CO;2-8
93. Waterfall C.M., Cobb B.D. Single tube genotyping of sickle cell anaemia using PCR-based SNP analysis. *Nucleic Acids Res.* 2001. V. 29(23). e119. doi: 10.1093/nar/29.23.e119
94. Wegmüller B., Lüthy J., Candrian U. 3'-5' proofreading-induced detection of point mutations by PCR using Tli DNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* 1995. V.23(2). P.311-312. doi: 10.1093/nar/23.2.311
95. Wu D.Y., Ugozzoli L., Pal B.K., Wallace R.B. Allele-specific enzymatic amplification of beta-globin genomic DNA for diagnosis of sickle cell anemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989. V. 86(8). P. 2757-2760. doi: 10.1073/pnas.86.8.2757
96. Xiong H, Li Y, Guo H, Xie Y, Zhao L, Gu J, Zhao S, Ding Y, Liu L. Genetic Mapping by Integration of 55K SNP Array and KASP Markers Reveals Candidate Genes for Important Agronomic Traits in Hexaploid Wheat. *Front Plant Sci.* 2021. V.12. 628478. doi: 10.3389/fpls.2021.628478
97. Yang HL, Jiang HJ, Fang WY, Xu YY, Liao DF, He FC. High fidelity PCR with an off/on switch mediated by proofreading polymerases combining with phosphorothioate-modified primer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005. V.328(1). P.265-272. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.12.159
98. Yang L, Zhao D, Meng Z, Xu K, Yan J, Xia X, Cao S, Tian Y, He Z, Zhang Y. QTL mapping for grain yield-related traits in bread wheat via SNP-based selective genotyping. *Theor Appl Genet.* 2020. V.133(3). P.857-872. doi: 10.1007/s00122-019-03511-0
99. Yang S., Shi H., Zhang Z., Chen Z., Yang W., Zhu W. Detection of Tri-allelic Single Nucleotide Polymorphisms of ABCB1 and CRP Genes by Penta-Primer Amplification Refractory Mutation System-Polymerase Chain Reaction. *Genet. Test. Mol. Biomarkers.* 2022. V. 26(1). P. 43-48. doi: 10.1089/gtmb.2021.0145
100. Ye S., Dhillon S., Ke X., Collins A.R., Day I.N. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res.* 2001. V. 29(17). E88-8. doi: 10.1093/nar/29.17.e88
101. Ye S., Humphries S., Green F. Allele specific amplification by tetra-primer PCR. *Nucleic Acids Res.* 1992. V. 20(5). P. 1152. doi: 10.1093/nar/20.5.1152
102. Yin G., Mitsuda Y., Ezaki T., Hamajima N. A new PCR method: one primer amplification of PCR-CTPP products. *Mol. Biotechnol.* 2012. V. 52(2). P. 180-183. doi: 10.1007/s12033-011-9485-4
103. Zetterquist H, Olerup O. Identification of the HLA-DRB1\*04, -DRB1\*07, and -DRB1\*09 alleles by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours. *Hum Immunol.* 1992. V.34(1). P.64-74. doi: 10.1016/0198-8859(92)90086-3
104. Zhang J., Li K. Single-base discrimination mediated by proofreading 3' phosphorothioate-modified primers. *Mol. Biotechnol.* 2003. V. 25(3). P. 223-228. doi: 10.1385/MB:25:3:223
105. Zhang J., Li K. The 3' terminal labeled primer extension: A new method of high throughput screening for SNP analysis. *Current Drug Discov.* 2001. V.9. P.21-24. (cited upon Zhang J., Li K., Pardinias J.R., Sommer S.S., Yao K.T. Proofreading genotyping assays mediated by high fidelity exo+ DNA polymerases. *Trends Biotechnol.* 2005. V. 23(2). P. 92-96. doi: 10.1016/j.tibtech.2004.12.009
106. Zhang J., Li K., Liao D., Pardinias J.R., Chen L., Zhang X. Different applications of polymerases with and without proofreading activity in single-nucleotide polymorphism analysis. *Lab. Invest.* 2003. V. 83(8). P. 1147-1154. doi: 10.1097/01.lab.0000081589.91390.df
107. Zhang J, Li K, Pardinias JR, Liao DF, Li HJ, Zhang X. SNP discrimination through proofreading and OFF-switch of exo+ polymerase. *Mol Biotechnol.* 2004. V.27(1). P.75-80. doi: 10.1385/MB:27:1:75
108. Zhang J., Li K., Pardinias J.R., Sommer S.S., Yao K.T. Proofreading genotyping assays mediated by high fidelity exo+ DNA polymerases. *Trends Biotechnol.* 2005. V. 23(2). P. 92-96. doi: 10.1016/j.tibtech.2004.12.009
109. Zhu K.Y., Clark J.M. Addition of a competitive primer can dramatically improve the specificity of PCR amplification of specific alleles. *Biotechniques.* 1996. V. 21(4). P. 586, 590. doi: 10.2144/96214bm04
110. Zhu S., Fushimi H., Cai S., Komatsu K. Species identification from Ginseng drugs by multiplex amplification refractory mutation system (MARMS). *Planta Med.* 2004. V. 70(2). P. 189-192. doi: 10.1055/s-2004-815502