



ЭНХАНСЕРЫ ПЦР. I. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Сахабутдинова А.Р.¹, Чемерис Д.А.², Чемерис А.В.¹, Гарафутдинов Р.Р.¹

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

²ООО «ГЕНВЕД», Москва, Россия

Резюме

ПЦР – самый популярный метод амплификации нуклеиновых кислот, характеризующийся высокой специфичностью и чувствительностью и нашедший применение, как в научных исследованиях, так и на практике. Однако при ПЦР-амплификации нуклеотидных последовательностей, называемых «трудными» матрицами, могут быть получены ложно-негативные результаты, когда мишень в реакционной смеси присутствует, но не обнаруживается. К такому же результату могут приводить соединения-примеси, совместно экстрагируемые с нуклеиновыми кислотами и ингибирующие ДНК-полимеразу. Для устранения указанной проблемы в реакционную смесь вносят вещества, называемые ПЦР-энхансерами, способные стабилизировать работу ДНК-полимеразы и/или, напротив, дестабилизировать водородные связи в GC-богатых участках, что позволяет, в том числе вести амплификацию длинных матриц. Описано использование в качестве ПЦР-энхансеров белков, аминокислот, углеводов, многоатомных спиртов, амидов, сульфонов, сульфоксидов, неионных детергентов, цвиттерийных соединений, различных наночастиц, а также аналогов дГТФ и дЦТФ, образующих две водородные связи вместо трех при спаривании с комплементарными им азотистыми основаниями.

Ключевые слова: ДНК, РНК, нуклеиновые кислоты, ПЦР, ПЦР-энхансеры, трудные матрицы, GC-богатые участки, амплификация длинных матриц

Цитирование: Сахабутдинова А.Р., Чемерис Д.А., Чемерис А.В., Гарафутдинов Р.Р. Энхансеры ПЦР. I. Общие сведения // *Biomics*. 2023. Т.15(3). С.218-223. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2023-20

© Авторы

PCR ENHANCERS. I. GENERAL INFORMATION

Sakhabutdinova A.R.¹, Chemeris D.A.², Chemeris A.V.¹, Garafutdinov R.R.¹

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

²GENVED LLC, Moscow, Russia

Resume

PCR is the most popular method for nucleic acids amplification, which characterized by high specificity and sensitivity. PCR is widely used in research and in practice. However, when nucleotide sequences, called “difficult” templates, are amplified, false-negative results can be obtained for samples containing a target in the reaction mixture. The same result can be caused by impurities that are co-extracted with nucleic acids and inhibit DNA polymerase. To eliminate this, substances called PCR enhancers are added to the reaction mixture, which can stabilize the DNA polymerase and/or, on the contrary, destabilize hydrogen bonds in GC-rich regions. The use of proteins, amino acids, carbohydrates, polyhydric alcohols, amides, sulfones, sulfoxides, nonionic detergents, zwitterionic compounds, various nanoparticles, as well as

analogues of dGTP and dCTP, which form two hydrogen bonds instead of three when paired with complementary nucleobases, is described.

Keywords: DNA, RNA, nucleic acids, PCR, PCR enhancers, difficult template, GC-rich sequences, long PCR

Citation: Sakhabutdinova A.R., Chemeris D.A., Chemeris A.V., Garafutdinov R.R. PCR enhancers. I. General information. *Biomcs.* 2023. T.15(3). C. 218-223. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2023-20 (In Russian)

© The Authors

Введение

С момента появления во второй половине 1980-х гг. полимеразной цепной реакции (ПЦР) с термостабильной ДНК-полимеразой она очень быстро начала использоваться во многих областях биологической науки и смежных дисциплинах, как в научных исследованиях, так и в практической деятельности. Однако, несмотря на свою кажущуюся простоту, этот метод требует внимательного к себе отношения, особенно при амплификации так называемых «трудных» матриц и при работе с экстрактами нуклеиновых кислот (НК), содержащих нежелательные примеси, ингибирующие работу ДНК-полимеразы. Для преодоления этих трудностей при проведении ПЦР используются различные приемы. Например, производится варьирование условий ПЦР и, в частности, изменение концентрации исходной НК путем ее разбавления для уменьшения количества ингибирующих агентов. Но этот способ не всегда может быть использован, так как в образцах с изначально малым количеством искомой ДНК или РНК применение данного подхода чревато получением ложноотрицательных результатов [Чемерис и др. (Chemeris et al.), 2012a]. Еще одна проблема подстерегает экспериментаторов, когда ввиду образования в ходе реакции огромного количества ампликонов происходит загрязнение ими всего лабораторного пространства, включая стоковые реактивы, что ведет к попаданию ампликонов из предыдущих амплификаций в готовящуюся реакционную смесь; в результате такие ампликоны приводят к ложно-положительным результатам. Для предотвращения этого предложено множество разных подходов, рассмотренных нами ранее [Чемерис и др. (Chemeris et al.), 2011; 2012; Garafutdinov et al., 2017].

При необходимости амплифицировать протяженные фрагменты ДНК, а также нуклеотидные последовательности с повышенным содержанием GC-пар (60% и более), способных образовывать нежелательные прочные вторичные структуры¹, преодолеть которые ДНК-полимераза оказывается не

в состоянии, такие матрицы называют «трудными»², поскольку они не поддаются обычной ПЦР-амплификации. В этом случае на помощь приходят так называемые ПЦР-энхансеры – "усилители" амплификации, причем они могут быть разной химической природы, а действие может быть обусловлено влиянием на разные компоненты реакционной смеси. При этом отдельные группы энхансеров способны частично купировать вредное (ингибирующее) действие разных веществ, ко-экстрагируемых вместе с НК. Всем этим вопросам будет посвящена серия статей, тогда как данная работа имеет вводный характер. Можно также порекомендовать ознакомиться с недавним обзором на эту тему зарубежных авторов [Karunanathie et al., 2022].

Прежде чем перейти к краткому рассмотрению различных ПЦР-энхансеров, следует заметить, что главная роль, которая им отводится, заключается в достижении уровня амплификации, позволяющего осуществлять уверенную детекцию нарабатываемых ампликонов (в повышении эффективности реакции). При этом энхансеры в меньшей степени отвечают за мишень-специфичность ПЦР (наработка исключительно целевых продуктов³),

¹ за счет формирования между ними трех водородных связей в отличие от АТ-пар с двумя водородными связями

² участки ДНК со множественными повторами из коротких мотивов, например СТG и им подобным, экспансия которых приводит в ряде случаев к передающимся по наследству генетическим заболеваниям, также являются «трудными» матрицами, в том числе по причине проскальзывания цепей ДНК при репликации, но внимания им здесь уделяться не будет так как их детекция требует отдельной статьи. Также за пределами рассмотрения останутся матрицы в виде древней ДНК, которая сильно фрагментирована и несет множественные модификации азотистых оснований, либо даже участки без оных [Гарафутдинов и др. (Garafutdinov et al.), 2015].

³ случаи использования ПЦР для направленного или даже ненаправленного мутагенеза типа ДНК-шаффлинга, а также проведения так называемой «склонной к ошибкам» ПЦР здесь в виду не имеем, хотя нарабатываемые в них ампликоны можно считать и целевыми, исходя из стоящих задач

поскольку она в первую очередь зависит от последовательности праймеров и температурных условий реакции.

Основные компоненты ПЦР

Основными компонентами классической ПЦР-реакционной смеси являются термостабильная ДНК-полимераза (или смесь таких ферментов), отвечающая за построение новых цепей ДНК, олигонуклеотидные праймеры, служащие затравочными молекулами после отжига последних на матрице, дезоксинуклеозидтрифосфаты (дНТФ), являющиеся субстратами для ДНК-полимераз при построении комплементарной цепи, служащие матрицами анализируемая (искомая) ДНК (или РНК), а также компоненты полимеразного буфера, включая кофактор ДНК-полимеразы – катионы магния (или марганца). Для вариантов ПЦР в реакционной смеси могут присутствовать и другие ингредиенты, повышающие эффективность ПЦР, краткому рассмотрению которых и посвящена эта статья.

В настоящее время при проведении ПЦР, помимо преимущественно используемой Taq полимеразы, применяется широкий спектр заметно различающихся по своим свойствам и других термостабильных ДНК-полимераз, выделенных из термофильных зубактерий или архей. Главными отличиями таких ферментов друг от друга служит наличие/отсутствие у них экзонуклеазных активностей, как природных, так и измененных генно-инженерным путем, а также присущие им разные температурные оптимумы. Эффективность ПЦР отчасти зависит от вида используемой полимеразы, но считать ее энхансером неверно. В то же время добавляемые для повышения стабильности ДНК-полимераз различные компоненты, в том числе белковой природы, уже можно считать энхансерами ПЦР.

Что касается молекул ДНК или РНК, фрагменты которых должны амплифицироваться в ходе ПЦР, то это наиболее варибельная часть реакционной смеси, поскольку их происхождение, чистота, размер, состояние, а также вносимое в реакцию количество зависит от очень многих факторов в зависимости от объектов, откуда производилось их выделение. Качество и количество внесенных в реакционную смесь НК определяет необходимость использования в ПЦР тех или иных энхансеров, если без их участия наработка целевого продукта оказывается недостаточной или не будет происходить вообще.

Олигонуклеотидные праймеры являются крайне важной составляющей ПЦР, поскольку именно от них зависит как специфичность, так и эффективность реакции и даже сама возможность

протекания ПЦР при наличии всех остальных ингредиентов⁴. Существует целый ряд требований к подбору праймерных последовательностей, включая использование в их составе модифицированных нуклеотидов, к длине праймеров, а также к определенному устройству праймеров в виде образования ими вторичных структур в зависимости от решаемых экспериментаторами задач, что рассмотрено нами ранее [Гарафутдинов и др. (Garafutdinov et al.), 2019; Garafutdinov et al., 2020]. Для подбора праймеров написано немало компьютерных программ в виде онлайн-утилит, выложенных в сети в качестве freeware дистрибутивов таких программ, а также в виде коммерческих продуктов [Чемерис и др., 2016; Akhmetzyanova et al., 2023].

В реакционной смеси в ПЦР должны обязательно присутствовать дНТФ – 2'-дезоксаденозин-5'-трифосфат (дАТФ), 2'-дезоксигуанозин-5'-трифосфат (дГТФ), 2'-дезоксцитидин-5'-трифосфат (дЦТФ), 2'-дезокситимидин-5'-трифосфат (дТТФ). дНТФ выполняют роль строительных блоков («кирпичиков») при построении комплементарной цепи ДНК; их включение в состав растущей цепи уже в виде монофосфатов (дНМФ) сопровождается высвобождением в реакционную среду пирофосфата, до некоторой степени ингибирующего работу ДНК-полимераз и являющегося одной из причин выхода реакции на плато и прекращения наработки ампликонов в геометрической прогрессии. Кроме обычных дНТФ, при необходимости может использоваться целый спектр их модификаций и аналогов сообразно стоящим задачам, служащих, в том числе своеобразными энхансерами ПЦР.

Поскольку ПЦР-реакционная смесь представляет собой буферный раствор, стоит уделить внимание и ему. Самым обычным буфером служит 10 – 20 мМ раствор трис-НСl (рН 8.3 при 20°C). Он характеризуется следующим температурным сдвигом рК: этот показатель снижается на 0.021 единиц с увеличением температуры на каждый градус, что приводит к тому, что буфер будет иметь значения рК от 7.7 во время отжига праймеров до 6.7 на стадии денатурации. Составной «солевой» частью буфера для ПЦР служит обычно 50 мМ КСl. Концентрация MgCl₂, необходимого для проявления ДНК-полимеразой ферментативной активности, варьирует

⁴ собственно при отсутствии любого из ключевых компонентов ПЦР полноценно реакция протекать не будет, не принимая во внимание возможное образование праймерных димеров или *ab initio* ПЦР [Ogata, Miura, 1998]

обычно от 0.5 до 10 мМ, что зависит в первую очередь от нуклеотидных последовательностей праймеров. Необходимо учитывать возможное присутствие в конечной реакционной смеси связывающей ионы магния ЭДТА или иных хелатирующих агентов, которые могут попасть с образцом НК и тем самым снизить эффективную концентрацию Mg^{2+} . Поскольку вода служит растворителем для всех ингредиентов ПЦР-реакционной смеси, следует заметить, что кроме обычной воды (H_2O) может быть использована «тяжелая» (D_2O или HDO), но широкого применения это не нашло в силу разных причин.

Таким образом, типичной ПЦР-реакционной смесью можно считать забуференный водный раствор объемом от 5 до 100 мкл, содержащий: от 1 фг до 1 мкг ДНК в зависимости от сложности генома (его размера) и копииности мишени в нем, а также от доступности материала, от 0.1 до 1 мкМ олигонуклеотидных праймеров, от 0.2 до 2 единиц активности подходящей термостабильной ДНК-полимеразы (или их смеси) и приблизительно по 200 мкМ каждого из четырех дНТФ (дАТФ, дЦТФ, дГТФ и дТТФ). Однако при амплификации «трудных» матриц обойтись типичной реакционной смесью удастся далеко не всегда, даже варьируя температурные параметры и временные интервалы реакции. Поэтому были предложены различные «усилители» ПЦР.

Различные энхансеры для улучшения ПЦР

В литературе описывается использование в качестве ПЦР-энхансеров различных соединений - белков, аминокислот, углеводов, многоатомных спиртов, амидов, сульфонов, сульфоксидов, неионных детергентов, цвиттерионных соединений, различных наночастиц, аналогов дГТФ и дЦТФ, образующих две водородные связи вместо трех при спаривании с комплементарными им азотистыми основаниями, и некоторых других веществ.

Большинство энхансеров можно условно отнести к одной из групп, исходя из решаемых задач и состояния препаратов НК. К первой можно отнести энхансеры, стабилизирующие ДНК-полимеразу путем сохранения ее нативности, что крайне важно для эффективной продолжительной работы фермента и амплификации протяженных фрагментов ДНК. Это требует более длительной элонгации и, соответственно, более длительного нахождения полимеразы при высоких температурах. Ко второй группе можно отнести вещества, способствующие дестабилизации цепей ДНК за счет снижения количества водородных связей между азотистыми основаниями, что приводит к исключению нежелательных вторичных структур, преодолеть

которые способны не все ДНК-полимеразы. При этом многие вещества из этих двух групп оказывают комплексное воздействие, способствующее амплификации как длинных, так и GC-богатых матриц, что в целом неудивительно. Еще одна группа веществ, повышающая эффективность ПЦР, непосредственно не влияет на фермент или на структуру НК, но способствует, например, более быстрой смене температур внутри реакционной смеси, сокращая время пребывания ДНК-полимеразы вблизи критических для нее значений температур, либо повышая локальную концентрацию действующих компонентов в составе реакционного буфера. Отдельно стоит выделить группу, включающую энхансеры, механизм действия которых пока неясен.

Поскольку детальному рассмотрению всех известных энхансеров ПЦР будут посвящены последующие статьи данной серии, здесь ограничимся лишь кратким перечислением используемых веществ, подразделив их по химическому принципу.

1. Неионные детергенты (Tween-20, Triton X-100, Nonidet P-40) способствуют сохранению ферментативной активности ДНК-полимеразы, обеспечивая амплификацию протяженных матриц.
2. Белки (бычий сывороточный альбумин, или BSA, фаговый белок T4 gene 32 protein) также положительно влияют на стабильность ДНК-полимеразы, улучшая наработку протяженных фрагментов ДНК. При этом использование этих и ряда других белков позволяет снижать влияние отдельных ингибиторов полимеразы.
3. Стабилизирующие эффекты оказывают на ДНК-полимеразу некоторые углеводы, среди которых наиболее часто применяются трегалоза, в том числе совместно с другими соединениями, например, с 1,2-пропандиолом. В некоторых работах сообщается, что трегалоза снижает температуру плавления ДНК (T_m).
4. Хотя основной растворитель для ПЦР – это деионизованная вода, дополнительными сольвентами могут служить некоторые органические растворители. Среди них выделяются сульфоксиды и сульфоны; диметилсульфоксид (ДМСО) стал одним из первых веществ этой группы, примененных еще в 1990 г., и широко используется и поныне. ДМСО снижает температуру плавления ДНК и улучшает амплификацию GC-богатых матриц. Установлено, что присутствие в реакционной смеси 1% ДМСО приводит к снижению T_m ДНК на 0,6°C. При этом стоит заметить, что ДМСО является наиболее популярной добавкой не

только в группе сульфоксидов и сульфонов, но и в целом среди всех веществ, используемых для улучшения ПЦР. К тому же ДМСО при амплификации трудных матриц часто применяется вместе с оказывающими подобный же эффект другими веществами, которых коснемся ниже.

5. Схожий эффект на температуру плавления ДНК оказывают и амиды. Из этой группы наиболее широко применяется формамид, препятствующий образованию водородных связей между азотистыми основаниями и тем самым облегчающий расхождение цепей ДНК. Считается, что 1% формамида в реакционной смеси снижает T_m ДНК на $0,72^\circ\text{C}$, что в ряде случаев может быть весьма полезным при ПЦР-амплификации матриц с высоким GC-составом.
6. Также к жидким ингредиентам, усиливающим ПЦР, относятся многоатомные спирты - этиленгликоль, пропиленгликоль, глицерин, полиэтиленгликоли (высокомолекулярные полиэтиленгликоли являются твердыми веществами). Показано, что ионная жидкость на основе имидазола также улучшала протекание ПЦР.
7. Считается, что ряд химических соединений (бетаин, пролин, гомоэктоин, хлорид тетраметиламмония либо иные соли тетраалкиламмония) сглаживают различия в температурах плавления ДНК с разным содержанием GC- и AT-пар, что также способствует повышению наработки целевых ампликонов в ПЦР в случае трудных матриц. При этом первые два (бетаин и пролин) как осмопротектанты способствуют также поддержанию активности ДНК-полимеразы.
8. Поскольку еще до появления ПЦР при секвенировании ДНК для исключения нежелательной вторичной структуры при построении комплементарных цепей ДНК для из разделения высоковольтным гель-электрофорезом вместо дезоксирибозина использовались его аналоги в виде dc^7GTP (7-деза-2'-дезоксирибозин трифосфата) и $dITP$ (дезоксиинозин трифосфата), формирующих с комплементарным им дезоксицитозиним только две водородные пары вместо трех, то этот подход нашел свое применение и в ПЦР при амплификации GC-богатых матриц. Причем dc^7GTP был применен в ПЦР еще в 1988 г. В ряде работ оба этих аналога природного дГТФ применяются совместно. С той же целью было предложено использовать и $N^4me-dCTP$ (N^4 метил-2'-деоксицитидин трифосфат).
9. Во многих работах показано улучшение протекания ПЦР под действием коктейля энхансеров в виде: формамида, ДМСО, глицерина; ДМСО, бетаина и dc^7GTP ; ДМСО, бетаина, дитиотрейтола и БСА; ДМСО, этиленгликоля, 1,2-пропандиола. Используются в ПЦР и другие комбинации энхансеров. В частности, показано применение дисульфида вольфрама, а также солей висмута совместно с ДМСО и глицерином.
10. После роста интереса к различным наноматериалам, целый их ряд также было предложено использовать в качестве энхансеров ПЦР, довольно подробный обзор таковых и производимых ими эффектов при амплификации НК, включая гипотезы о возможных механизмах их действия проведен в работе турецких авторов [Yuce et al., 2014]. Среди них – коллоидные наночастицы золота разных диаметров, углеродные нанотрубки, в том числе с различными покрытиями, оксид графена, восстановленный оксид графена, квантовые точки, фуллерен, наночастицы ряда металлов и их оксидов (Ag, TiO_2) в том числе магнитные наночастицы (Fe_3O_4).

Заключение

Как видно из изложенного выше, в качестве энхансеров ПЦР могут выступать вещества различной природы. Причем показано, что одни и те же химические соединения могут служить в качестве усилителей протекания ПЦР, оказывая влияние на разные компоненты реакционной смеси. Но нужно также заметить, что при превышении допустимых концентраций в реакционной смеси всех этих энхансеров они из таковых превращаются в ингибиторы амплификации. В то же время, если концентрация энхансеров будет ниже критической, то заметного эффекта на протекание ПЦР они оказать не смогут. В сопровождающих статьях будут приведены, в том числе и концентрационные значения используемых энхансеров и детальная информация о производимых ими эффектах.

Литература

1. Гарафутдинов Р.Р., Баймиев Ан.Х., Малеев Г.В., Алексеев Я.И., Зубов В.В., Чемерис Д.А., Кирьянова О.Ю., Губайдуллин И.М., Матниязов Р.Т., Сахабутдинова А.Р., Никоноров Ю.М., Кулуев Б.Р., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. Разнообразие праймеров для ПЦР и принципы их подбора. *Биомика*. 2019. Т.11(1). С. 23 – 70. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2019-04
2. Гарафутдинов Р.Р., Нагаев Н.Р., Сахабутдинова А.Р., Чемерис А.В. Аутентичность, сохранность и доступность древней ДНК // *Вестник*

- Башкирского университета. 2015. Т. 20. № 2. С. 432-439.
3. Чемерис А.В., Магданов Э.Г., Гарафутдинов Р.Р., Вахитов В.А. Как исключить появление ложнопозитивных результатов при проведении полимеразной цепной реакции? // Вестн. биотехнол. физ.-хим. биол. 2012. Т. 8(3). С. 34-45.
 4. Чемерис А.В., Чемерис Д.А., Магданов Э.Г., Гарафутдинов Р.Р., Нагаев Н.Р., Вахитов В.А. Причины ложно-негативной ПЦР и недопущение некоторых из них // Биомика. 2012. Т. 4(1). С. 31-47.
 5. Чемерис Д.А., Кирьянова О.Ю., Губайдуллин И.М., Чемерис А.В. Дизайн праймеров для полимеразной цепной реакции (краткий обзор компьютерных программ и баз данных) // Биомика. 2016. Т. 8(3). С. 215-238.
 6. Чемерис Д.А., Магданов Э.Г., Машков О.И., Гарафутдинов Р.Р., Чемерис А.В. ПЦР с отложенным (горячим или задержанным) стартом // Биомика. 2011. Т. 2. № 1. С. 1-8.
 7. Akhmetzianova L.U., Davletkulov T.M., Sakhabutdinova A.R., Chemeris A.V., Gubaydullin I.M., Garafutdinov R.R. LAMPprimers iQ: New primer design software for loop-mediated isothermal amplification (LAMP) // *Anal. Biochem.* 2023. V. 684. 115376. doi: 10.1016/j.ab.2023.115376
 8. Garafutdinov R.R., Galimova A.A., Sakhabutdinova A.R. Polymerase chain reaction with nearby primers // *Anal. Biochem.* 2017. V.518. P. 126-133. doi: 10.1016/j.ab.2016.11.017
 9. Garafutdinov R.R., Galimova A.A., Sakhabutdinova A.R. The influence of quality of primers on the formation of primer dimers in PCR // *Nucleos. Nucleot. Nucleic acids.* 2020. V. 39(9). P. 1251-1269. doi: 10.1080/15257770.2020.1803354
 10. Karunanathie H, Kee PS, Ng SF, Kennedy MA, Chua EW. PCR enhancers: Types, mechanisms, and applications in long-range PCR // *Biochimie.* 2022. V.197. P.130-143. doi: 10.1016/j.biochi.2022.02.009
 11. Ogata N, Miura T. Creation of genetic information by DNA polymerase of the thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* // *Nucleic Acids Res.* 1998. V.26(20). P.4657-4661. doi: 10.1093/nar/26.20.4657
 12. Yuce M., Kurt H., Mokkapat V.R.S.S., Budak B. Employment of nanomaterials in polymerase chain reaction: insight into the impacts and putative operating mechanisms of nano-additives in PCR // *RSC Advances.* 2014. V.4(69). P.36800-36814. doi: 10.1039/c4ra06144f
 - (LAMP). *Anal. Biochem.* 2023. V. 684. 115376. doi: 10.1016/j.ab.2023.115376
 2. Chemeris A.V., Chemeris D.A., Magdanov E.G., Garafutdinov R.R., Nagaev N.R., Vakhitov V.A. Causes of false-negative PCR and how to avoid some of them. *Biomics.* 2012. V. 4. P. 31-47. (In Russian)
 3. Chemeris A.V., Magdanov E.G., Garafutdinov R.R., Vakhitov V.A. How to exclude the appearance of false-positive results during the polymerase chain reaction? *Vestn. biotechnol. fiz.-chem. biol.* 2012. V. 8(3). P. 34-45. (In Russian)
 4. Chemeris D.A., Kiryanova O.Yu., Gubaydullin I.M., Chemeris A.V. Design of primers for polymerase chain reaction (Brief review of software and databases). *Biomics.* 2016. V. 8(3). P.215-238. (In Russian)
 5. Chemeris D.A., Magdanov E.G., Mashkov O.I., Garafutdinov R.R., Chemeris A.V. Hot start or time-release PCR. *Biomics.* 2011. V.2(1). P.1-8. (In Russian)
 6. 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., Nikonov 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)
 7. Garafutdinov R.R., Galimova A.A., Sakhabutdinova A.R. Polymerase chain reaction with nearby primers // *Anal. Biochem.* 2017. V.518. P. 126-133. doi: 10.1016/j.ab.2016.11.017
 8. Garafutdinov R.R., Galimova A.A., Sakhabutdinova A.R. The influence of quality of primers on the formation of primer dimers in PCR. *Nucleos. Nucleot. Nucleic acids.* 2020. V. 39(9). P. 1251-1269. doi: 10.1080/15257770.2020.1803354
 9. Garafutdinov R.R., Nagaev N.R., Sakhabutdinova A.R., Chemeris A.V. Authenticity, integrity and availability of ancient DNA. *Vestnik Bashkirskogo universiteta.* 2015. V.20(2). P. 432-439. (In Russian)
 10. Karunanathie H, Kee PS, Ng SF, Kennedy MA, Chua EW. PCR enhancers: Types, mechanisms, and applications in long-range PCR. *Biochimie.* 2022. V.197. P.130-143. doi: 10.1016/j.biochi.2022.02.009
 11. Ogata N, Miura T. Creation of genetic information by DNA polymerase of the thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* // *Nucleic Acids Res.* 1998. V.26(20). P.4657-4661. doi: 10.1093/nar/26.20.4657
 12. Yuce M., Kurt H., Mokkapat V.R.S.S., Budak B. Employment of nanomaterials in polymerase chain reaction: insight into the impacts and putative operating mechanisms of nano-additives in PCR. *RSC Advances.* 2014. V.4(69). P.36800-36814. doi: 10.1039/c4ra06144f

References

1. Akhmetzianova L.U., Davletkulov T.M., Sakhabutdinova A.R., Chemeris A.V., Gubaydullin I.M., Garafutdinov R.R. LAMPprimers iQ: New primer design software for loop-mediated isothermal amplification