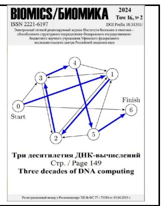
BIOMICS/БИОМИКА

ISSN 2221-6197 http://biomicsj.ru



ВАРИАНТЫ ПЦР С БОЛЕЕ ЧЕМ ДВУМЯ ПРАЙМЕРАМИ. II. ПРИНЦИП И ОСОБЕННОСТИ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР

[1]Зубов В.В.*, [2]Сахабутдинова А.Р., [3]Чемерис Д.А., [2]Гарафутдинов Р.Р., [2]Чемерис А.В.

[1]ООО «ИзоГель», Пущино, Московская область, Россия, *E-mail: genseq@mail.ru
[2]Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра
Российской академии наук, Уфа, Россия
[3]ООО «ГЕНВЕД», Москва, Россия

Резюме

Рассмотрены принцип и особенности мультиплексной ПЦР, акцентировано внимание на преимуществах этого варианта реакции: снижении временных, финансовых и трудозатрат при массовых анализах, а также возможности анализа малого количества генетического материала. Отмечено, что качественно подобранные праймеры являются главным фактором, обеспечивающим специфичность мультиплексной ПЦР, однако и прочие компоненты реакционной смеси должны быть оптимизированы. Продемонстрировано отличие мультиплексной ПЦР от мультиматричной ПЦР. Приведены данные о способах повышения эффективности мультиплексной ПЦР, среди которых особое место занимают «горячий старт» и измененные протоколы термоциклирования. Уделено внимание истории появления мультиплексной ПЦР и используемой терминологии.

Ключевые слова: ПЦР, мультиплексная ПЦР, праймеры

Цитирование: Зубов В.В., Сахабутдинова А.Р., Чемерис Д.А., Гарафутдинов Р.Р., Чемерис А.В. Варианты ПЦР с более чем двумя праймерами. II. Принцип и особенности мультиплексной ПЦР // Biomics. 2024. Т.16(2). С.234-243. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2024-14

VARIANTS OF PCR WITH MORE THAN TWO PRIMERS. II. THE PRINCIPLE AND FEATURES OF MULTIPLEX PCR.

[1]Zubov V.V.*, [2]Sakhabutdinova A.R., [3]Chemeris D.A., [2]Garafutdinov R.R., [2]Chemeris A.V.

[1]IsoGel LLC, Pushchino, Moscow District, Russia, *E-mail: genseq@mail.ru
[2]Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Centre,
Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia
[3]GENVED LLC, Moscow, Russia

Resume

The principle and features of multiplex PCR are considered. Attention is focused on the advantages of the reaction: reduction of time, financial and labor costs during parallel analyses, as well as the possibility of analyzing a small amount of genetic material. It is noted that high-quality primers are the main factor ensuring the specificity of multiplex PCR, but other components of the reaction mixture should also be optimized. The difference between multiplex PCR and multitemplate PCR is demonstrated. Data on methods for increasing the efficiency of multiplex PCR are presented, among which "hot start" and modified thermal cycling protocols are emphasized. Attention is paid to the history of multiplex PCR and the terminology used.

Keywords: PCR, multiplex PCR, primers

Citation: Variants of PCR with more than two primers. II. The principle and features of multiplex PCR. *Biomics*. 2024. V.16(2). P. 234-243. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2024-14 (In Russian)

Введение

В январе 1988 г. была опубликована пионерная статья о ПЦР с термостабильной ДНК-полимеразой, которая в дальнейшем произвела настоящую революцию в биологии, а позже и в смежных дисциплинах. Ее развитием стала появившаяся в конце того же 1988 г. мультиплексная ПЦР, довольно широко использующаяся сейчас в диагностических целях. Опубликовано уже огромное количество статей по мультиплексной ПЦР, но здесь будет уделено внимание лишь основам данного подхода и некоторым другим вопросам.

Если рассмотренная нами вложенная ПЦР, также рассчитанная на использование более чем двух праймеров [Сахабутдинова и др. (Sakhabutdinova et al.), 2024], имеет главными предназначениями повышение чувствительности и увеличение специфичности реакции, то мультиплексная ПЦР преследует цель как сэкономить время, силы и средства при проведении массовых анализов, так и обеспечить возможность ее проведения при малом количестве исходного генетического материала. Мультиплексная ПЦР используется также для решения некоторых других задач, что достигается объединением наборов праймеров к разным мишеням в одной реакционной смеси, и вместо множества параллельных реакций в разных пробирках они все одновременно идут в одной. Стоит отметить, что при разработке соответствующих наборов праймеров необходимо приложить заметно больше усилий, поскольку при проведении мультиплексной ПЦР резко возрастают требования к их качеству [Гарафутдинов и др. (Garafutdinov et al.), 2019], в том числе для исключения возникновения ложно-позитивных результатов. Но для борьбы с этой напастью существует свой ряд подходов, части которых, непосредственно примененных для мультиплексной ПЦР, здесь коснемся.

Мультиплексную (multiplex) ПЦР все же не следует путать с мультиматричной (multitemplate) ПЦР[1], в которой для амплификации схожих, но несколько отличающихся последовательностей из различных анализируемых образцов используется одинаковая пара праймеров, тогда как в классической мультиплексной ПЦР пар праймеров для амплификации разных локусов может быть много, а анализируемый образец – один. При этом такой образец может нести в себе генетический материал нескольких организмов, как например, в препарате тотальной ДНК человека могут присутствовать анализируемые ДНК или РНК различных вирусов. Однако нужно признать, что многие авторы в статьях разных лет не делают особых различий между мультиплексным и мультиматричным вариантами ПЦР.

Также расширенный комплект праймеров применяется в аллель-специфичной ПЦР, но она была рассмотрена нами ранее [Чемерис и др. (Chemeris et al.), 2022] и тут ее касаться не будем. Множественными праймерами служат еще участки случайным образом фрагментированной ДНК при осуществлении ускоренной искусственной эволюции *in vitro* путем ДНК-шаффлинга, но этот метод мы также описали ранее [Бикбулатова и др. (Bikbulatova et al.), 2009].

К настоящему времени предложено множество вариантов проведения мультиплексной ПЦР, однако они будут рассмотрены отдельно в другой статье, тогда как здесь остановимся лишь на основных принципах, особенностях, а также обозначениях этой реакции, с которых следует начать, не забывая о довольно поучительной истории ее появления.

Краткая история появления и терминология мультиплексной ПЦР

Впервые о мультиплексной ПЦР было сообщено в конце 1988 г. двумя группами исследователей, независимо друг от друга выполнивших эксперименты по совместной амплификации ряда мишеней в ходе ПЦР в одной реакционной смеси. Рукопись одной статьи была получена редакцией журнала Nucleic Acids Research 24 августа 1988 г. и после ревизии принята к публикации 28 октября [Chamberlain et al., 1988]. Причем в заголовке данной статьи непосредственно упоминалось о ‘multiplex DNA amplification’. Авторам удалось проамплифицировать одновременно шесть локусов из разных экзонов гена дистрофина с размерами ампликонов от 268 до 547 п.н. Другая статья была получена редакцией того же журнала Nucleic Acids Research несколько позднее, 14 октября 1988 г., и принята в печать без ревизии 4 ноября [Jeffreys et al., 1988]. Однако в ней использовалось другое обозначение для мультиплексной ПЦР в виде

[1] Мультиматричной ПЦР посвящена довольно подробная обзорная статья [Kalle et al., 2014].

со-амплификации[2] с помощью ПЦР аллельных вариантов двух минисателлитных последовательностей генома человека, но с более крупными размерами ампликонов: 1.5, 1.6, 2.8 и 5.6 т.п.н. Причем ввиду малого стартового количества ДНК для их выявления после 25 циклов ПЦР пришлось прибегнуть к блот-гибридизации по Саузерну с радиоактивными пробами. Интересно то, что вышли обе эти статьи в одном номере журнала 9 декабря 1988 г., причем согласно нумерации вторая вышла даже на несколько страниц «раньше» первой.

Впоследствии пошел вал статей с использованием данной технологии, но впервые словосочетание ‘PCR multiplex’ (на французском языке) в названии статьи появилось в сентябре 1989 г. [Claustres et al., 1989]. В следующем 1990 г. вышло уже несколько статей, в заголовках которых фигурировало ‘multiplex PCR’. В итоге возникло устойчивое словосочетание для обозначения одновременной амплификации с помощью ПЦР в одной реакционной смеси разных мишеней - ‘multiplex PCR’. Однако следует заметить, что посвященных мультиплексной ПЦР обзорных статей общего плана крайне мало [Chamberlain et al., 1994; Edwards, Gibbs, 1994; Wittwer et al., 2001], поскольку многие исследователи делали акцент в своих обзорах на отдельных направлениях применения этого варианта ПЦР в виде детекции вирусов, бактериофагов, бактерий, различных локусов высших организмов [Elnifro et al., 2000; Settanni L, Corsetti, 2007; De Lellis et al., 2008; Yang et al., 2022].

Единой аббревиатуры для обозначения мультиплексной ПЦР до сих пор нет. В разных статьях можно встретить использование следующих сокращений – ‘MPCR’, ‘M-PCR’, ‘mPCR’, ‘m-PCR’, ‘MP-PCR’, ‘mpPCR’, ‘multi-PCR’. В одной из ранних работ в 1990 г. такая ПЦР была названа как ‘FM-PCR’ (Fast Multiplex), хотя в ней не было предложено почти ничего, заметно ускоряющего анализ. В подавляющем большинстве публикаций сокращения не применяются, и данная реакция упоминается как ‘multiplex PCR’, а в русскоязычных публикациях – «мультиплексная ПЦР», чего мы здесь также будем придерживаться. При этом иногда конкретизуются масштабы мультиплексирования в виде дуплексной ПЦР, триплексной, тетраплексной (квадруплексной), пентаплексной ПЦР и т.д. Можно встретить и такие обозначения – ‘2-4 plex’, ‘100-plex’, ‘MegaPlex’ и ‘high-plex’. Но когда в рамках одной статьи сравниваются мультиплексная ПЦР с ПЦР с отдельными парами праймеров на одну из мишеней, то последнюю называют по-разному – ‘monoplex’, ‘singleplex’, ‘simplex’, а также – ‘uniplex’ или вкупе с мультиплексной ПЦР как ‘uni- and multiplex PCR’. Но с обозначением ‘uniplex’ не все просто, поскольку в части таких статей подразумевается не единичная пара праймеров к конкретной мишени, а сокращение от ‘universal’, когда во втором раунде мультиплексной ПЦР применяются универсальные праймеры, позволяющие амплифицировать весь пул ампликонов из первого раунда благодаря тому, что на 5’-концах специфичных праймеров располагаются экстрапоследовательности для отжига на них этих самых универсальных праймеров, которые в каждой работе, конечно же, были свои, поскольку не должны «конфликтовать» (образовывать димеры) со специфичными участками праймеров.

В ряде работ упоминается также ‘semi-multiplex’ или ‘semimultiplex’[3] ПЦР, в которой один из праймеров является общим для всех ампликонов, в том числе принадлежащих разным образцам, и в этой связи эти варианты мультиплексной ПЦР на самом деле ближе к мультиматричной ПЦР. Хотя есть примеры и действительно ‘semi-multiplex’ ПЦР. Так, практически одновременно китайскими и индийскими авторами опубликованы статьи, в которых сообщалось об изготовлении с помощью мультиплексной ПЦР маркерных «лестниц» для проведения гель-электрофореза [Wang et al., 2010; Gopalakrishnan et al., 2010]. Причем в обеих работах эти авторы готовили их на основе ДНК фага лямбда, но из разных его мест. Так, в статье [Wang et al., 2010] был выбран участок в положениях от 6631 до 7630 п.н., и с использованием одного общего обратного праймера и 10 уникальных прямых была создана лестница из 10 «ступеней» до 1000 п.н. с шагом в 100 п.н. Другие авторы выбрали участок от 1136 до 2136 п.н. и с помощью общего прямого праймера и шести уникальных обратных получили лестницу из 6 ступеней с размерами в 100, 200, 400, 600, 800 и 1000 п.н. [Gopalakrishnan et al., 2010]. Еще в одной работе систему из одного общего прямого и нескольких обратных праймеров использовали для оценки температурных пределов этапов денатурации и отжига праймеров в ПЦР со сближенным их расположением [Garafutdinov et al., 2017]. Фактически во всех этих работах использовалась самая настоящая ‘semi-

[2] Данный пример показывает, как важно правильно назвать новый метод и еще вынести эти слова в заголовок, поскольку при описании мультиплексной ПЦР и упоминании того, кто ее предложил, указывают только на работу Chamberlain и соавт. [1988], а вышедшую одновременно с ней статью Jeffreys и соавт. [1988] никак не увязывают с появлением мультиплексной ПЦР.

[3] что можно перевести на русский как «наполовину мультиплексная» ПЦР

multiplex’ ПЦР, но авторы воздержались от такого ее обозначения.

Основной принцип мультиплексной ПЦР и ее предназначение

Основной принцип мультиплексной ПЦР заключается в использовании в одной реакционной смеси с единичным образцом сразу нескольких пар праймеров, позволяющих путем наработки соответствующих ампликонов детектировать разные мишени, преимущественно отличающегося размера. Таковыми служат различные участки генома исследуемого организма, и в качестве примера можно привести уже упоминавшиеся выше фрагменты экзонов гена дистрофина, или так называемые STR-локусы, используемые для ДНК-идентификации личности. Другим типом образцов является тотальная ДНК, содержащая, кроме ДНК основного организма, иной генетический материал, которым могут быть нуклеиновые кислоты вирусов, бактерий либо прочих организмов. На рис. 1 и 2 приведены схемы таких вариантов мультиплексной ПЦР с разными типами образцов.

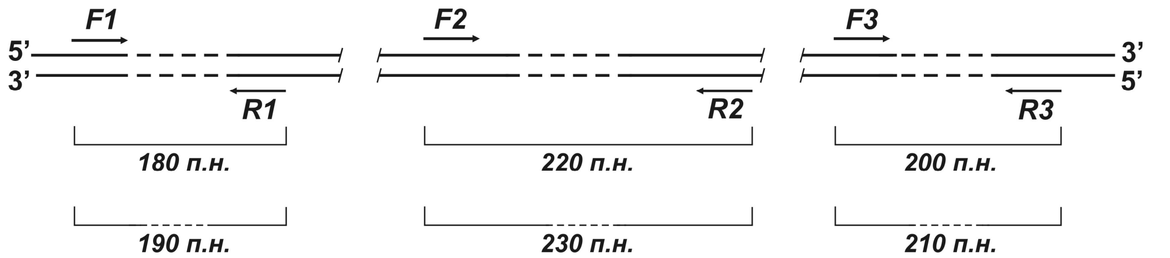


Рис. 1. Схема отжига праймеров на тотальной ДНК исследуемого образца (пояснения в тексте).
Fig. 1. The scheme of primer annealing on the total DNA of the studied specimen (explanations in the text).

Как правило, в мультиплексной ПЦР анализируется один образец ДНК, в котором с помощью разных пар праймеров амплифицируются выбранные участки. Так, на рис. 1 изображена молекула двуцепочечной ДНК с местами отжига на ней прямых и обратных праймеров, обозначенных F и R соответственно. Разрывы цепей, показанные пунктиром, символизируют имеющийся в этих местах полиморфизм ДНК по размеру, что как раз характерно для STR-локусов. При этом праймеры необходимо подбирать с таким расчетом, чтобы размеры ожидаемых ампликонов не перекрывались (не накладывались) между собой.

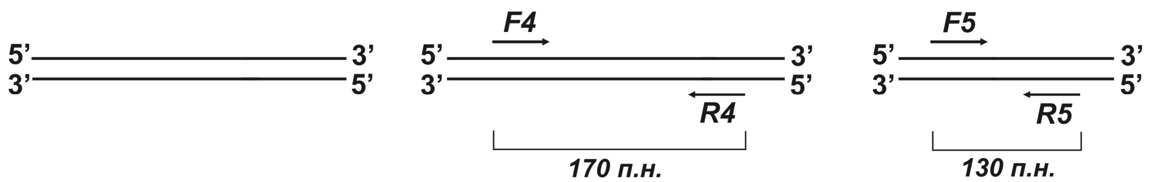


Рис. 2. Схема отжига праймеров на тотальной ДНК исследуемого образца, несущего также иной генетический материал (пояснения в тексте).
Fig. 2. The scheme of primer annealing on the total DNA of the studied specimen, which also carries other genetic material (explanations in the text).

Однако мультиплексная ПЦР может проводиться и с целью обнаружения в одном образце разного генетического материала, что показано на рис. 2, на котором схематично изображены фрагменты трех молекул ДНК, представляющих собой, например, ДНК человека (без мест отжига праймеров, рассчитанных на выявление неких вирусов) и ДНК/РНК двух разных вирусов, характеризующихся ампликонами отличающихся размеров.

Важной чертой мультиплексной ПЦР являются повышенные требования к подбору праймеров, ограничивающих участки мишеней неодинаковых размеров, поскольку изначально детекция ампликонов в таком варианте ПЦР велась исключительно с помощью гель-электрофореза. В настоящее время арсенал методов детекции ампликонов в мультиплексной ПЦР заметно расширился, но по-прежнему гель-электрофорез широко используется, в том числе для анализа в приборах капиллярного типа меченных разными флуорохромами STR-локусов в целях ДНК-идентификации человека [Чемерис и др. (Chemeris et al.), 2022]. Для этого анализируемые STR-локусы «разбивают» на ряд размерных групп, меченных своими флуорохромами, что повышает производительность прибора – капиллярного ДНК-секвенатора. Но еще до применения капиллярного гель-электрофореза подобные разделения ампликонов STR-локусов велись в гелях пластинчатого типа, и помимо регистрации флуоресценции полосы ДНК окрашивались серебром [Lins et al., 1996], а еще раньше использовалась также и радиоактивная метка.

Ранее детекция продуктов мультиплексной ПЦР велась «по конечно точке», но с появлением ПЦР в режиме реального времени этот вариант проведения амплификации со своими преимуществами, возможностями и ограничениями распространился и на мультиплексную ПЦР [Бикбулатова и др. (Bikbulatova et al.), 2012]. Так, стало возможным проводить анализ в реальном времени, не открывая пробирки и тем самым не загрязняя лабораторные помещения ампликонами, при этом мультиплексность стала зависеть от числа используемых флуоресцентных красителей с отличающимися длинами волн возбуждения/испускания и соответствующих им приборов – ДНК-термоциклеров с разным числом каналов детекции флуоресценции. В этом случае различающиеся длины ампликонов оказываются не столь обязательными. Но в случае применения после завершения ПЦР в реальном времени плавления ампликонов с использованием специфичного к любой двухцепочечной ДНК красителя SYBR Green I мультиплексность уже напрямую зависит от различающихся длин выбранных мишеней. Однако использование при плавлении ампликонов гибридизационных зондов, меченных разными флуорохромами, дает дополнительные возможности. Довольно подробно мультиплексная ПЦР в режиме реального времени рассмотрена в довольно старом обзоре Wittwer и соавт. [2001], в котором рассмотрены различные подходы, включающие системы TaqMan, Molecular Beacon и прочие, в том числе с FRET-эффектом.

Иные способы детекции результатов мультиплексной ПЦР в виде рестрикционного анализа, SSCP-анализа и прочих подходов будут рассмотрены в нашей последующей статье.

Основным предназначением мультиплексной ПЦР является ускорение получения результатов, особенно при массовых анализах, что достигается одновременной амплификацией различных мишеней в одном образце, в том числе содержащем разный генетический материал. Но при этом требуется предварительная тщательная выверка подобранных комплектов праймеров. Важное значение мультиплексная ПЦР приобретает при анализе генетического материала, доступного в крайне малом количестве, которое не может быть разделено, например, на 10 пробирок, а при его нахождении в одной пробирке с 10 парами праймеров все они смогут найти свои мишени.

Помимо вышеупомянутых обзоров по мультиплексной ПЦР имеются и другие ранние публикации, в которых пошагово детально проанализированы все нюансы этой реакции [Henegariu et al., 1997; Markoulatos et al., 2002]. В них отмечается, что мультиплексная ПЦР требует стратегического планирования, множественных попыток оптимизации данной реакции, подбора правильных концентраций праймеров, дНТФ, буфера, ионов магния, режимов термоциклирования и целого ряда других моментов.

Различные улучшения проведения мультиплексной ПЦР

Выше мы уже упомянули о предложении использовать в мультиплексной ПЦР так называемые универсальные праймеры и некоем превращении этой реакции в формат ‘uniplex’. Впервые об этом было сообщено в 1995 и в 1996 г. двумя группами авторов, практически одновременно выполнившими сходные эксперименты. В первой работе авторы использовали праймеры, названные ими «химерными», 3’-конец которых был специфичным к анализируемому локусу, а по 20 нуклеотидов 5’-концов прямых и обратных праймеров несли места для отжига ‘universal primer sequence’ фага M13mp18, что в итоге делало ампликоны на 40 п.н. длиннее [Shuber et al., 1995]. Другие авторы как раз ввели для данного варианта ПЦР термин ‘uniplex’ и использовали дополнительную последовательность для одновременной амплификации 26 локусов в отдельном раунде такой ПЦР [Lin et al., 1996]. Позже было предложено использовать в мультиплексной ПЦР в качестве универсальных праймеры, содержащие ковалентно-замкнутые LNA-нуклеозиды и обеспечивающие за счет этого более высокую температуру отжига/плавления, что позволило повысить чувствительность и специфичность реакции [Chen et al., 2016].

Использование в реакционной смеси одновременно множества праймеров требует исключения их удлинения за счет образования гомо- и гетеродимеров, для чего может применяться так называемый «горячий старт», когда в силу разных причин ДНК-полимераза оказывается неспособной осуществлять полимеризацию ДНК. Ранее мы уделили довольно большое внимание этому вопросу [Чемерис и др. (Chemeris et al.), 2011]. Отметим, что в случае образования относительно прочных гомо- и гетеродимеров праймеров «горячий старт» не обеспечивает необходимой специфичности амплификации [Garafutdinov et al., 2020].

Тем не менее, здесь коротко коснемся моментов, рекомендованных непосредственно для проведения мультиплексной ПЦР, хотя нужно признать, что они в принципе универсальны и пригодны для многих прочих вариантов ПЦР. Так, в одной из работ [Kebelmann-Betzing et al., 1998] было показано, что использование в мультиплексной ПЦР ДНК-полимеразы AmpliTaq Gold повышает эффективность амплификации, что неудивительно, поскольку данный фермент несет химическую модификацию, позволяющую ему проявлять свою ферментативную активность только после высокотемпературного прогрева. Для улучшения протекания мультиплексной ПЦР предлагалось использовать дНТФ, содержащие термолабильную 3'-тетрагидрофурановую группу, отщепляющуюся при высокой температуре, что обеспечивало «горячий старт» и не давало возможности удлиняться праймерам неспецифично при относительно низкой температуре [Le et al., 2009]. Другими авторами рекомендовалось для мультиплексной ПЦР использовать праймеры, содержащие на удлиняемом 3'-конце различные термолабильные группы, удаляемые при достижении высокой температуры в первом цикле ПЦР [Hidalgo Ashrafi, Paul, 2009; Shum, Paul, 2009], в том числе в мультиплексной ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией [Hidalgo Ashrafi et al., 2009].

Кроме «горячего старта», некоторого улучшения мультиплексной ПЦР удалось добиться включением в реакционную смесь квантовых точек из CdTe [Liang et al., 2011]. Авторы отметили, что их добавление уменьшало накопление неспецифических продуктов, но упомянули о том, что избыточное количество квантовых точек может ингибировать ПЦР.

Как уже говорилось выше, серьезную проблему в мультиплексной ПЦР может представлять неодинаковая эффективность наработки различных ампликонов. Для борьбы с этим, помимо использования разной концентрации исходных пар праймеров, предлагались и другие подходы. Так, в одной из работ описано применение ступенчатого повышения температур при термоциклировании [Kapley et al., 2000]. В частности, было показано, что на стадии отжига праймеров режим в виде ступенчатого нагрева - 45^{o}C/10 сек, 51^{o}C/30 сек, 54^{o}C/30 сек, 57^{o}C/60 сек и 60^{o}C/60 сек оказался наиболее подходящим для наработки ампликонов с размерами 309, 435 и 598 п.н. Ранее другие авторы для улучшения результатов мультиплексной ПЦР ввели на стадии отжига праймеров субциклирование, заключающее в четырехкратной смене температур с 65^{o}C на 60^{o}C и обратно [Liu, Sommer, 1998]. В еще одной работе [Lopes et al., 1999] сообщается об использовании после четвертого цикла так называемого 'pit-stop', во время которого для количественного сглаживания наработки конечных ампликонов производили добавление новых пар праймеров, заведомо лучше амплифицирующих свои мишени.

Было показано, что использование для амплификации STR-локусов праймеров, несущих в своем составе несколько LNA-нуклеотидов, значительно улучшало чувствительность мультиплексной ПЦР [Ballantyne et al., 2008; 2011]. Проведение мультиплексной ПЦР в присутствии термостабильного белка RecA, выделенного из бактерии *Thermus thermophilis*, заметно повышало специфичность отжига праймеров, катализируя спаривание полностью гомологичных участков, и, соответственно, позволило снизить концентрацию самих праймеров [Shigemori et al., 2005], что обеспечивало некоторую экономию этих компонентов ПЦР.

Искусственное расширение генетического «алфавита» не обошло стороной и мультиплексную ПЦР. Так, было показано, что в «шестибуквенной» ПЦР системы AEGIS (artificially expanded genetic information system) исключается образование праймерных димеров [Yang et al., 2010]. В другой своей работе эти авторы [Hoshika et al., 2010] для проведения мультиплексной ПЦР использовали иную четырехбуквенную систему SAMRS (self-avoiding molecular-recognition system). Ее преимуществом является то, что модифицированные нуклеотиды A*, C*, G* и T* спариваются с им комплементарными обычными азотистыми основаниями, но не способны образовывать пары A*-T* и C*-G*, что также облегчает подбор праймеров и повышает эффективность мультиплексной ПЦР.

Заключение

В настоящее время мультиплексная ПЦР весьма востребована, особенно в тех случаях, когда ощущается нехватка генетического материала для исследования/анализа. При этом затрачиваемые усилия по разработке и отработке индивидуально любой мультиплексной ПЦР в итоге окупаются сторицей. Главная роль в этом отводится оптимальному подбору множества праймеров, для чего написаны соответствующие компьютерные программы, в том числе ориентированные непосредственно на мультиплексную ПЦР. Но они заслуживают отдельного рассмотрения. Здесь можно только заметить, что программ дизайна праймеров для различных вариантов ПЦР создано уже более полутора сотен [Чемерис и др. (Chemeris et al.), 2016] и их число продолжает расти.

Как уже говорилось выше, мультиплексная ПЦР получила довольно широкое распространение в силу своего удобства для массовых анализов, особенно в плане одновременной детекции множества мишеней, в том числе при нехватке генетического материала. Завершая данную статью, стоит упомянуть, что мультиплексная ПЦР "вышла" за пределы нашей Планеты, поскольку на околоземной орбите на Международной космической станции была успешно проведена подобная амплификация в режиме реального времени с системой TaqMan [Parra et al., 2017]. ДНК-термоциклером служил прибор ‘Smart Cycler’ фирмы Cepheid (США). Авторы отметили, что мультиплексная ПЦР может пригодиться при полетах в дальний космос. Так ли это будет или нет – покажет время.

Литература

1. Бикбулатова С.М., Мингазетдинова С.Р., Чемерис А.В., Вахитов В.А. Эволюция in vitro – есть ли предел методам «перетасовки» генов? // Успехи современной биологии. 2009. Т. 129(4). С. 323-335.
2. Бикбулатова С.М., Чемерис Д.А., Никоноров Ю.М., Машков О.И., Гарафутдинов Р.Р., Чемерис А.В., Вахитов В.А. Способы детекции результатов полимеразной цепной реакции в режиме реального времени // Вестн. Башгосуниверситета. 2012. Т. 17. № 1. С. 59-67.
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. Кулуев Б.Р., Баймиев Ан.Х., Геращенков Г.А., Юнусбаев У.Б., Гарафутдинов Р.Р., Алексеев Я.И., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. Сто лет гаплоидным геномам. Сейчас наступает время диплоидных // Биомика. 2020. Т.12(4). С. 411-434. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-33
5. Чемерис А.В., Аминев Ф.Г., Гарафутдинов Р.Р., Анисимов В.А., Сагитов А.М., Хуснутдинова Э.К., Сахабутдинова А.Р., Чемерис Д.А., Михайленко К.И. ДНК-криминалистика. М.: Наука. 2022. 466 С.
6. 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. 2022. Т.14(1). С. 32-51. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2022-2
7. 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.
8. Ashrafi EH, Paul N. Heat-activatable primers for hot-start PCR and hot-start one-step RT-PCR: endpoint and real-time experiments // Curr Protoc Mol Biol. 2009. Chapter 15. Unit 15.9. doi: 10.1002/0471142727.mb1509s88
9. Ballantyne KN, van Oorschot RA, Mitchell RJ. Locked nucleic acids in PCR primers increase sensitivity and performance // Genomics. 2008. V.91(3). P.301-305. doi: 10.1016/j.ygeno.2007.10.016
10. Ballantyne KN, van Oorschot RA, Mitchell RJ. Increased amplification success from forensic samples with locked nucleic acids // Forensic Sci Int Genet. 2011. V.5(4). P.276-280. doi: 10.1016/j.fsigen.2010.04.001
11. Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Nguyen PN, Caskey CT. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification // Nucleic Acids Res. 1988. V.16(23). P.11141-11156. doi: 10.1093/nar/16.23.11141
12. Chen R, Gao XB, Yu XL, Song CX, Qiu Y. Novel multiplex PCR assay using locked nucleic acid (LNA)-based universal primers for the simultaneous detection of five swine viruses // J Virol Methods. 2016. V.228. P.60-66. doi: 10.1016/j.jviromet.2015.11.018
13. Claustres M, Kjellberg P, Desgeorges M, Bellet H, Sarda P, Bonnet H, Boileau C. Detection des deletions par amplification d'exons (PCR multiplex) dans la myopathie de Duchenne // J. Genet. Hum. 1989. V.37(3). P.251-257.
14. De Lellis L, Curia MC, Veschi S, Aceto GM, Morgano A, Cama A. Methods for routine diagnosis of genomic rearrangements: multiplex PCR-based methods and future perspectives // Expert Rev Mol Diagn. 2008 Jan;8(1):41-52. doi: 10.1586/14737159.8.1.41
15. Edwards MC, Gibbs RA. Multiplex PCR: advantages, development, and applications // PCR Methods Appl. 1994 Feb;3(4):S65-75. doi: 10.1101/gr.3.4.s65
16. Elnifro EM, Ashshi AM, Cooper RJ, Klapper PE. Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology // Clin Microbiol Rev. 2000. V.13(4). P.559-570. doi: 10.1128/CMR.13.4.559
17. 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.
18. 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.

19. Gopalakrishnan R, Joseph S, Sellappa S. Constructing a DNA ladder Range for Lambda Phage by multiplex PCR // Iran J Microbiol. 2010. V.2(4). P.210-212.
20. Henegariu O, Heerema NA, Dlouhy SR, Vance GH, Vogt PH. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol // Biotechniques. 1997. V.23(3). P.504-511. doi: 10.2144/97233rr01
21. Hidalgo Ashrafi E, Yee J, Paul N. Selective control of primer usage in multiplex one-step reverse transcription PCR // BMC Mol Biol. 2009. V.10. 113. doi: 10.1186/1471-2199-10-113
22. Hoshika S, Chen F, Leal NA, Benner SA. Artificial genetic systems: self-avoiding DNA in PCR and multiplexed PCR // Angew Chem Int Ed Engl. 2010. V.49(32). P.5554-5557. doi: 10.1002/anie.201001977
23. Jeffreys AJ, Wilson V, Neumann R, Keyte J. Amplification of human minisatellites by the polymerase chain reaction: towards DNA fingerprinting of single cells // Nucleic Acids Res. 1988. V.16(23). P.10953-10971. doi: 10.1093/nar/16.23.10953
24. Kalle E, Kubista M, Rensing C. Multi-template polymerase chain reaction // Biomol Detect Quantif. 2014. V.2. P.11-29. doi: 10.1016/j.bdq.2014.11.002
25. Kapley A, Lample K, Purohit H. Thermocycling steps and optimization of multiplex PCR // Biotechnology Lett. 2000. V.22. P.1913-1918. doi: 10.1023/A:1026748202071
26. Kebelmann-Betzing C, Seeger K, Dragon S, Schmitt G, Moricke A, Schild TA, Henze G, Beyermann B. Advantages of a new Taq DNA polymerase in multiplex PCR and time-release PCR // Biotechniques. 1998. V.24(1). P.154-158. doi: 10.2144/98241pf01
27. Le T., Ashrafi E.H., Paul N. Enhancing multiplex PCR efficiency using Hot Start dNTPs // BioTechniques. 2009. V.47(5). P.972–973. doi: 10.2144/000113298
28. Liang G, Ma C, Zhu Y, Li S, Shao Y, Wang Y, Xiao Z. Enhanced Specificity of Multiplex Polymerase Chain Reaction via CdTe Quantum Dots // Nanoscale Res Lett. 2011. V.6(1). 51. doi: 10.1007/s11671-010-9797-5
29. Lin Z, Cui X, Li H. Multiplex genotype determination at a large number of gene loci. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Mar 19;93(6):2582-7. doi: 10.1073/pnas.93.6.2582
30. Lins AM, Sprecher CJ, Puers C, Schumm JW. Multiplex sets for the amplification of polymorphic short tandem repeat loci--silver stain and fluorescence detection // Biotechniques. 1996. V.20(5). P.882-889. doi: 10.2144/96205rr01
31. Liu Q, Sommer SS. Subcycling-PCR for multiplex long-distance amplification of regions with high and low GC content: application to the inversion hotspot in the factor VIII gene // Biotechniques. 1998. V.25(6). P.1022-1028. doi: 10.2144/98256rr01
32. Lopes RF, Moreno Senna JP, Chies JM, Rodrigues JL. Pit-stop PCR: an approach to increase final product yield of multiplex PCR // Biotechniques. 1999. V.26(4). P.638-639. doi: 10.2144/99264bm09
33. Markoulatos P, Siafakas N, Moncany M. Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach // J Clin Lab Anal. 2002. V.16(1). P.47-51. doi: 10.1002/jcla.2058
34. Parra M, Jung J, Boone TD. et al. Microgravity validation of a novel system for RNA isolation and multiplex quantitative real time PCR analysis of gene expression on the International Space Station // PLoS One. 2017. V.12(9). e0183480. doi: 10.1371/journal.pone.0183480
35. Settanni L, Corsetti A. The use of multiplex PCR to detect and differentiate food- and beverage-associated microorganisms: a review // J Microbiol Methods. 2007. V.69(1). P.1-22. doi: 10.1016/j.mimet.2006.12.008
36. Shigemori Y, Mikawa T, Shibata T, Oishi M. Multiplex PCR: use of heat-stable Thermus thermophilus RecA protein to minimize non-specific PCR products // Nucleic Acids Res. 2005. V.33(14). e126. doi: 10.1093/nar/gni111
37. Shuber AP, Grondin VJ, Klinger KW. A simplified procedure for developing multiplex PCRs // Genome Res. 1995. V.5(5). P.488-493. doi: 10.1101/gr.5.5.488
38. Shum J, Paul N. Chemically modified primers for improved multiplex polymerase chain reaction // Anal Biochem. 2009. V.388(2). P.266-272. doi: 10.1016/j.ab.2009.02.033
39. Wang TY, Guo L, Zhang JH. Preparation of DNA ladder based on multiplex PCR technique // J Nucleic Acids. 2010. 2010. 421803. doi: 10.4061/2010/421803
40. Wittwer CT, Herrmann MG, Gundry CN, Elenitoba-Johnson KS. Real-time multiplex PCR assays // Methods. 2001. V.25(4). P.430-442. doi: 10.1006/meth.2001.1265
41. Yang J, Li D, Wang J, Zhang R, Li J. Design, optimization, and application of multiplex rRT-PCR in the detection of respiratory viruses // Crit Rev Clin Lab Sci. 2022. V.59(8). P.555-572. doi: 10.1080/10408363.2022.2072467
42. Yang Z, Chen F, Chamberlin SG, Benner SA. Expanded genetic alphabets in the polymerase chain reaction // Angew Chem Int Ed Engl. 2010. V.49(1). P.177-180. doi: 10.1002/anie.200905173

References

1. Ashrafi EH, Paul N. Heat-activatable primers for hot-start PCR and hot-start one-step RT-PCR: endpoint and real-time experiments // Curr Protoc Mol Biol. 2009. Chapter 15. Unit 15.9. doi: 10.1002/0471142727.mb1509s88

2. Ballantyne KN, van Oorschot RA, Mitchell RJ. Locked nucleic acids in PCR primers increase sensitivity and performance // Genomics. 2008. V.91(3). P.301-305. doi: 10.1016/j.ygeno.2007.10.016
3. Ballantyne KN, van Oorschot RA, Mitchell RJ. Increased amplification success from forensic samples with locked nucleic acids // Forensic Sci Int Genet. 2011. V.5(4). P.276-280. doi: 10.1016/j.fsigen.2010.04.001
4. Bikbulatova SM, Mingazetdinova SR, Chemeris AV, Vakhitov VA. In Vitro Evolution – Is There Any Limit for Methods of Gene Shuffling? *Uspekhi sovremennoi Biologii*. 2009. V.129(4). P.323-335. (In Russian)
5. Bikbulatova S.M., Chemeris D.A., Nikonorov Yu.M., Mashkov O.I., Garafutdinov R.R., Chemeris A.V., Vakhitov V.A. Detection of the results of polymerase chain reaction in real-time mode // *Vestn. Bashkir State University*. 2012. V. 17. No. 1. P. 59-67. (In Russian)
6. Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Nguyen PN, Caskey CT. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification // Nucleic Acids Res. 1988. V.16(23). P.11141-11156. doi: 10.1093/nar/16.23.11141
7. Chemeris A.V., Aminev F.G., Garafutdinov R.R., Anisimov V.A., SagitovA.M., Khusnutdinova E.K., Sakhabutdinova A.R., Chemeris D.A., Mihaylenko K.I. DNK-kriminalistika. M.: Nauka. 2022. 466 S. [DNA criminalistics] (In Russian)
8. 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)
9. 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)
10. Chen R, Gao XB, Yu XL, Song CX, Qiu Y. Novel multiplex PCR assay using locked nucleic acid (LNA)-based universal primers for the simultaneous detection of five swine viruses // J Virol Methods. 2016. V.228. P.60-66. doi: 10.1016/j.jviromet.2015.11.018
11. Claustres M, Kjellberg P, Desgeorges M, Bellet H, Sarda P, Bonnet H, Boileau C. Detection des deletions par amplification d'exons (PCR multiplex) dans la myopathie de Duchenne // J. Genet. Hum. 1989. V.37(3). P.251-257.
12. De Lellis L, Curia MC, Veschi S, Aceto GM, Morgano A, Cama A. Methods for routine diagnosis of genomic rearrangements: multiplex PCR-based methods and future perspectives // Expert Rev Mol Diagn. 2008 Jan;8(1):41-52. doi: 10.1586/14737159.8.1.41
13. Edwards MC, Gibbs RA. Multiplex PCR: advantages, development, and applications // PCR Methods Appl. 1994 Feb;3(4):S65-75. doi: 10.1101/gr.3.4.s65
14. Elnifro EM, Ashshi AM, Cooper RJ, Klapper PE. Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology // Clin Microbiol Rev. 2000. V.13(4). P.559-570. doi: 10.1128/CMR.13.4.559
15. 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)
16. 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
17. 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
18. Gopalakrishnan R, Joseph S, Sellappa S. Constructing a DNA ladder Range for Lambda Phage by multiplex PCR. // Iran J Microbiol. 2010. V.2(4). P.210-212.
19. Henegariu O, Heerema NA, Dlouhy SR, Vance GH, Vogt PH. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol // Biotechniques. 1997. V.23(3). P.504-511. doi: 10.2144/97233rr01
20. Hidalgo Ashrafi E, Yee J, Paul N. Selective control of primer usage in multiplex one-step reverse transcription PCR // BMC Mol Biol. 2009. V.10. 113. doi: 10.1186/1471-2199-10-113
21. Hoshika S, Chen F, Leal NA, Benner SA. Artificial genetic systems: self-avoiding DNA in PCR and multiplexed PCR // Angew Chem Int Ed Engl. 2010. V.49(32). P.5554-5557. doi: 10.1002/anie.201001977
22. Jeffreys AJ, Wilson V, Neumann R, Keyte J. Amplification of human minisatellites by the polymerase chain reaction: towards DNA fingerprinting of single cells // Nucleic Acids Res. 1988. V.16(23). P.10953-10971. doi: 10.1093/nar/16.23.10953
23. Kalle E, Kubista M, Rensing C. Multi-template polymerase chain reaction // Biomol Detect Quantif. 2014. V.2. P.11-29. doi: 10.1016/j.bdq.2014.11.002
24. Kapley A, Lample K, Purohit H. Thermocycling steps and optimization of multiplex PCR // Biotechnology Lett. 2000. V.22. P.1913-1918. doi: 10.1023/A:1026748202071
25. Kebelmann-Betzing C, Seeger K, Dragon S, Schmitt G, Moricke A, Schild TA, Henze G, Beyermann

B. Advantages of a new Taq DNA polymerase in multiplex PCR and time-release PCR // Biotechniques. 1998. V.24(1). P.154-158. doi: 10.2144/98241pf01
26. Kuluev B.R., Baymiev An.Kh., Gerashchenkov G.A., Yunusbaev U.B., Garafutdinov R.R., Alekseev Ya.I., Baymiev Al.Kh., Chemeris A.V. One hundred years of haploid genomes. Now time comes for diploid genomes. *Biomics*. 2020. V. 12(4). P. 411-434. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-33 (In Russian)
27. Le T., Ashrafi E.H., Paul N. Enhancing multiplex PCR efficiency using Hot Start dNTPs // BioTechniques. 2009. V.47(5). P.972–973. doi: 10.2144/000113298
28. Liang G, Ma C, Zhu Y, Li S, Shao Y, Wang Y, Xiao Z. Enhanced Specificity of Multiplex Polymerase Chain Reaction via CdTe Quantum Dots // Nanoscale Res Lett. 2011. V.6(1). 51. doi: 10.1007/s11671-010-9797-5
29. Lin Z, Cui X, Li H. Multiplex genotype determination at a large number of gene loci. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Mar 19;93(6):2582-7. doi: 10.1073/pnas.93.6.2582
30. Lins AM, Sprecher CJ, Puers C, Schumm JW. Multiplex sets for the amplification of polymorphic short tandem repeat loci--silver stain and fluorescence detection // Biotechniques. 1996. V.20(5). P.882-889. doi: 10.2144/96205rr01
31. Liu Q, Sommer SS. Subcycling-PCR for multiplex long-distance amplification of regions with high and low GC content: application to the inversion hotspot in the factor VIII gene // Biotechniques. 1998. V.25(6). P.1022-1028. doi: 10.2144/98256rr01
32. Lopes RF, Moreno Senna JP, Chies JM, Rodrigues JL. Pit-stop PCR: an approach to increase final product yield of multiplex PCR // Biotechniques. 1999. V.26(4). P.638-639. doi: 10.2144/99264bm09
33. Markoulatos P, Siafakas N, Moncany M. Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach // J Clin Lab Anal. 2002. V.16(1). P.47-51. doi: 10.1002/jcla.2058
34. Parra M, Jung J, Boone TD. et al. Microgravity validation of a novel system for RNA isolation and multiplex quantitative real time PCR analysis of gene expression on the International Space Station // PLoS One. 2017. V.12(9). e0183480. doi: 10.1371/journal.pone.0183480
35. Settanni L, Corsetti A. The use of multiplex PCR to detect and differentiate food- and beverage-associated microorganisms: a review // J Microbiol Methods. 2007. V.69(1). P.1-22. doi: 10.1016/j.mimet.2006.12.008
36. Shigemori Y, Mikawa T, Shibata T, Oishi M. Multiplex PCR: use of heat-stable Thermus thermophilus RecA protein to minimize non-specific PCR products // Nucleic Acids Res. 2005. V.33(14). e126. doi: 10.1093/nar/gni111
37. Shuber AP, Grondin VJ, Klinger KW. A simplified procedure for developing multiplex PCRs // Genome Res. 1995. V.5(5). P.488-493. doi: 10.1101/gr.5.5.488
38. Shum J, Paul N. Chemically modified primers for improved multiplex polymerase chain reaction // Anal Biochem. 2009. V.388(2). P.266-272. doi: 10.1016/j.ab.2009.02.033
39. Wang TY, Guo L, Zhang JH. Preparation of DNA ladder based on multiplex PCR technique // J Nucleic Acids. 2010. 2010. 421803. doi: 10.4061/2010/421803
40. Wittwer CT, Herrmann MG, Gundry CN, Elenitoba-Johnson KS. Real-time multiplex PCR assays // Methods. 2001. V.25(4). P.430-442. doi: 10.1006/meth.2001.1265
41. Yang J, Li D, Wang J, Zhang R, Li J. Design, optimization, and application of multiplex rRT-PCR in the detection of respiratory viruses // Crit Rev Clin Lab Sci. 2022. V.59(8). P.555-572. doi: 10.1080/10408363.2022.2072467
42. Yang Z, Chen F, Chamberlin SG, Benner SA. Expanded genetic alphabets in the polymerase chain reaction // Angew Chem Int Ed Engl. 2010. V.49(1). P.177-180. doi: 10.1002/anie.200905173