



## ПРИЧИНЫ ЛОЖНО-НЕГАТИВНОЙ ПЦР И НЕДОПУЩЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ИЗ НИХ

Чемерис А.В., Чемерис Д.А., Магданов Э.Г., Гарафутдинов Р.Р., Нагаев Н.Р., Вахитов В.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и генетики  
Уфимского научного центра Российской академии наук, Уфа, [chemeris@anrb.ru](mailto:chemeris@anrb.ru)

### Резюме

Проведен анализ имеющейся литературы методического плана, посвященной вопросам возникновения ложно-негативных результатов при проведении ПЦР. Главное внимание уделено ингибированию реакции веществами различной природы, а также улучшению процесса амплификации с помощью некоторых добавок и за счет применения различных, в том числе, генно-инженерным путем модифицированных ДНК-полимераз.

*Ключевые слова:* ПЦР, обратнo-транскрипционная ПЦР, ОТ-ПЦР, ложно-негативная ПЦР, ампликон, ДНК-полимераза, обратная транскриптаза, ДНК, РНК, нуклеиновые кислоты, экстракция, ингибиторы, усилители

### Введение

При проведении такой высокочувствительной и при этом высокоспецифичной реакции, коей является полимеразная цепная реакция (ПЦР), иногда случаются как ложно-положительные, так и ложно-негативные результаты, что представляет серьезную проблему, особенно при диагностических исследованиях. Так, неверно сделанный анализ может показать, например, что у некоего пациента присутствует (при ложно-положительной ПЦР) возбудитель какой-либо инфекции, тогда как у него его нет, или, напротив, этиологический агент выявлен не будет (при ложно-негативной ПЦР), а он на самом деле имеется. И то, и другое крайне плохо. Причины возникновения ложной ПЦР может быть немало, и они весьма различны. Целью данной статьи является рассмотрение ложно-негативных результатов при ПЦР и возможностей их исключения, поскольку причины появления ложно-положительных результатов и способы борьбы с ними нами рассмотрены ранее в другой статье [Чемерис и др., 2012].

Ложно-негативные результаты при проведении ПЦР могут возникать в силу нескольких обстоятельств. Так, одной из важных причин может быть плохой подбор праймеров. Однако здесь он приниматься во внимание не будет, так как, во-первых, это составляет тему отдельной статьи, а во-вторых - ложно-негативная ПЦР происходит и с хорошо подобранными праймерами. Поэтому при

дальнейшем описании будет априори подразумеваться, что к праймерам никаких претензий нет. Равно как и к выбранным режимам термоциклирования и ДНК-термоциклерам. Хотя нельзя исключать, что в случае использования ДНК-термоциклеров с твердотельными реакционными блоками отдельные ячейки могут работать некорректно, и это надо специально проверять при зародившемся подозрении. Собственно включение в диагностикумы положительного контроля и его успешная амплификация должны свидетельствовать, что ПЦР протекает, как планировалось, и причины ложно-негативной ПЦР (при действительном наличии в исследуемом образце искомым последовательностей - хотя иногда откуда это может быть известно?) необходимо искать в чем-то другом. Например, в недостаточном количестве циклов при проведении ПЦР, в результате чего из-за малого количества исходных копий-мишеней должно увеличение числа ампликонов не произойдет и не будет достигнут детектируемый уровень, который при обычной<sup>1</sup> ПЦР по конечной точке или в режиме реального времени составляет, как правило, около триллиона молекул. Однако в этом случае отсутствие детектируемого продукта может быть вызвано не

<sup>1</sup> Здесь под обычной ПЦР подразумевается любой вариант данной реакции в пробирках, планшетах или капиллярах в объемах от 10 до 100 мкл.

только слишком малым числом исходных копий, но и зависящей в том числе от самого образца<sup>2</sup> эффективностью амплификации<sup>3</sup>, которая может быть сниженной из-за различных ингибиторов данного процесса. Другими причинами отсутствия желаемых ампликонов могут быть особенности нуклеотидных последовательностей амплифицируемого участка (слишком высокий GC-состав, наличие большого числа повторяющихся мотивов типа CTG или им подобных, наличие шпилечных структур и др.), излишняя длина ограниченного праймерами фрагмента ДНК, особенно при анализе образцов, в которых размер сохранившихся молекул ДНК весьма ограничен - например, поврежденных высокотемпературным воздействием, или имеющих криминогенное происхождение и плохо сохранившихся, а также при исследовании древней ДНК, где часты случаи отсутствия в некоторых местах сахарофосфатного скелета молекул ДНК отдельных азотистых оснований, не позволяющих ДНК-полимеразе при репликации «проходить» такие участки. Однако рассмотрение особенностей амплификации таких «трудных» образцов также выходит за рамки данной статьи, и этому вопросу будет посвящен отдельный материал. Другими, также не рассматриваемыми здесь причинами ложно-негативной ПЦР может быть некое изменение нуклеотидной последовательности (мутации, делеции, инсерции), приходящееся на выбранный участок амплификации, и имеющее место в исследуемом образце, или если целевой ампликон имеет плазмидное расположение, а у анализируемого штамма плазида оказалась полностью элиминированной, и такие случаи известны.

Таким образом, в данной статье главное внимание будет уделено причинам ингибирования ПЦР конкретными веществами органической и неорганической природы и способам преодоления такой ложно-негативной ПЦР.

#### **Источники ингибирования ПЦР**

Итак, полное или частичное ингибирование протекания ПЦР ввиду присутствия в реакционной смеси нежелательных веществ может приводить к ложно-негативным результатам. Причем такие ухудшающие или блокирующие реакцию

«нечистоты» все же чаще привносятся с исследуемым образцом, поскольку стандартные ингредиенты для проведения ПЦР (термостабильная ДНК-полимераза, олигонуклеотидные праймеры, дНТФ, буфер, MgCl<sub>2</sub>, бычий сывороточный альбумин - БСА, вода, минеральное масло) и реакционные сосуды (разнообразная пластиковая или стеклянная посуда однократного применения) доступны из многих проверенных коммерческих источников и не должны изначально содержать нежелательных ингибирующих примесей<sup>4</sup>.

Пока еще микрожидкостная ПЦР не вошла в широкую практику и носит главным образом исследовательский характер, однако для этой разновидности ПЦР существуют свои особенности и, в частности, налицо ингибирующий эффект некоторых материалов, используемых для формирования микрожидкостных каналов. Отчасти это объясняется, тем, что соотношение используемых объемов жидкости (варьирующих обычно от сотен пиколитров до десятков нанолитров) к поверхности стенок реакционных сосудов/каналов кардинально отличается от такового при проведении ПЦР в обычных пробирках или планшетах. Соответственно влияние окружающих раствор материалов резко возрастает. Так, в одной недавней статье проведен подробный анализ многих органических, неорганических материалов и металлов на предмет сорбции на них различных компонентов ПЦР, влияющих на ингибирование процесса амплификации [Kodzius et al., 2012]. Лучшее всего себя проявило пирексное стекло, а сильнее всего ингибировал ПЦР полиметилметакрилат. Ингибирующее влияние на ПЦР в микрожидкостных устройствах за счет сорбции на нем ДНК-полимеразы оказывает кремний [Wang et al., 2006]. Поскольку особенностям ПЦР в микрожидкостных устройствах посвящена другая наша статья, находящаяся в печати, то более подробно на этом вопросе здесь останавливаться не будем [Магданов и др., 2013].

Справедливости ради следует заметить, что в литературе упоминается загрязнение реакционных пробирок тальком с резиновых перчаток при их смене с целью исключения ложно-позитивных результатов, что может приводить к результатам ложно-негативным [de Lomas et al., 1992]. Вероятно, последнее можно объяснить или сорбцией ДНК на

<sup>2</sup> Точнее от содержания в образце тех или иных сопутствующих веществ, способных оказать влияние на процесс амплификации.

<sup>3</sup> Теория ПЦР и эффективность размножения молекул ДНК с помощью данной реакцией является темой другой готовящейся статьи, и посему на этих вопросах здесь останавливаться не будем.

<sup>4</sup> Потенциально все ингредиенты ПЦР и пластиковая посуда могут содержать нежелательные примеси в виде загрязняющей ДНК, напротив способствующей (неспецифичной) амплификации, что уже было рассмотрено нами ранее [Чемерис и др., 2012].

данном порошке, являющемся магнием-содержащим минералом из подкласса слоистых силикатов, или возникающей в растворе чрезмерной концентрацией магния. Такое ингибирование, впрочем, легко исключить, меняя перчатки более аккуратно.

Также после некоторых воздействий извне, например, ультрафиолетовым светом с той же целью исключения при ПЦР ложно-положительных результатов, отдельные ингредиенты, а также реакционные емкости приобретали свойство ингибировать ПЦР. Так, в одной работе было показано, что длительная обработка вазелинового масла ультрафиолетовым светом для удаления нежелательной загрязняющей ДНК приводит к ингибированию амплификации, видимо, ввиду окисления образующимся озоном каких-то компонентов масла, причем степень ингибирования была прямо пропорциональна длительности облучения [Dohner et al., 1995]. При этом другими авторами отмечается, что УФ-обработка вазелинового масла при условии добавления в него в качестве антиоксиданта оксихинолина не приводила к эффекту ингибирования ПЦР [Gilgen et al., 1995]. Продолжительное облучение УФ-светом воды в полипропиленовых пробирках также вызывает значительное (по крайней мере, на два порядка) снижение эффективности ПЦР, но объяснения этому авторы, как они сами замечают, не нашли [Pao et al., 1993]. Об ингибировании ПЦР в полипропиленовых пробирках, подвергнутых воздействию УФ-света, сообщают и другие авторы [Burgess, Hall, 1999], причем наличие в пробирках в момент облучения водного раствора, содержащего в качестве антиоксидантов или альфа-токоферол, или тот же оксихинолин вместе с аскорбиновой кислотой и пропилгаллатом и последующая аспирация данного раствора не снижали уровня ингибирования. Некая связь между ложно-положительными и ложно-негативными результатами в ПЦР содержится в работе, посвященной вопросам контроля за контаминацией при ПЦР с помощью протирочных тестов [McCormack et al., 1997]. Так, авторами было обнаружено, что если в контрольную амплификацию брать слишком много материала (жидкости, образовавшейся в результате центрифугирования влажной салфетки после ее использования для протирания поверхностей), то, несмотря на значительное количество загрязняющей ДНК (до 20 тысяч копий), последняя может не выявиться из-за ингибирования ПЦР некими смытыми «нечистотами». В качестве рекомендации в статье содержится совет брать меньшее количество жидкости при проведении подобных проверок на чистоту помещений и оборудования с помощью ПЦР.

Помимо самих анализируемых препаратов нуклеиновых кислот, ведущих свое происхождение из того или иного материала, откуда непосредственно велась экстракция ДНК или РНК, и которые потенциально могут нести ингибиторы реакции, присущие этим материалам, некоторое ингибирующее воздействие могут оказывать отдельные компоненты растворов, применяемых при консервации образцов (гепарин, формальдегид), при выделении нуклеиновых кислот, в случае их присутствия в остаточных количествах в конечном препарате. Считается, что к таким можно отнести буквально все используемые ингредиенты буфера экстракции (в особенности ЭДТА, как хелатирующего агента, связывающего ионы магния) и депротеинизирующих растворов, только их остаточные количества, достаточные для ингибирования ПЦР, будут сильно различаться. Также ингибирующий эффект могут оказывать некоторые дополнительно вносимые компоненты при экстракции нуклеиновых кислот из особых тканей или жидкостей. Уже довольно давно датскими авторами [Rossen et al., 1992] был проделан огромный объем экспериментальной работы и установлены количественные показатели содержания в препаратах нуклеиновых кислот большого числа веществ (компоненты экстрагентов, питательных сред, антибиотики и пр.), способных выступить в качестве ингибиторов ПЦР, приведенных в табличной форме, и заинтересованные читатели могут непосредственно обратиться к этой статье.

Обычно остаточные загрязнения экстрагентом, ЭДТА или фенолом с хлороформом, как правило, довольно легко удаляются диализом, пересаживанием и промывкой изопропанолом, этанолом и удалением последних (которые также могут ингибировать ферментативную реакцию) подсушиванием образца. Таким образом, все же основными ингибиторами амплификации являются попутно выделяемые нежелательные примеси в анализируемых препаратах нуклеиновых кислот, экстрагируемых из тех или иных объектов самыми различными методами.

#### **Методы выделения нуклеиновых кислот для проведения ПЦР**

Казалось бы, что тут такого сложного - выделить нуклеиновые кислоты в относительно чистом виде?! На самом деле это первый и весьма непростой этап при анализе (амплификации) ДНК и тем более РНК. Безусловно, выделение нуклеиновых кислот из чистых стерильных культур заметно отличается от таковых из природных или техногенных объектов. В том числе в плане

попутной экстракции различных ингибиторов. В чистых культурах также могут присутствовать некие ингибиторы ПЦР как в виде естественных метаболитов, так и в виде различных компонентов культуральных сред [Rossen et al., 1992], однако то, что они могут оказаться в конечных препаратах нуклеиновых кислот, фактически ожидаемо, да и концентрации ингибиторных субстанций прогнозируемы. Во всех иных случаях при экстракции нуклеиновых кислот часто могут оказаться непредсказуемые примеси (или в неожиданных количествах), что создает определенную проблему.

Для научных исследований или диагностических анализов нуклеиновые кислоты выделяют из нескольких категорий объектов. Поскольку нуклеиновые кислоты присущи представителям всех царств живого, то соответственно они могут иметь вирусное, бактериальное, протозоа, грибное, растительное или животное происхождение. Однако объекты, из которых выделяют, например, вирусную ДНК или РНК, могут быть очень разными, начиная от фактически неживой окружающей среды (воздуха, воды, почвы) и заканчивая техногенными объектами (готовыми пищевыми продуктами), естественно включая нуклеиновые кислоты, присущие всевозможным живым организмам. Таким образом, потенциальные ингибиторы ПЦР при анализе вирусного материала, например, будут иметь соответствующее происхождение - при выявлении вирусной инфекции у человека это может быть гемоглобин, билирубин, меланин и пр. До некоторой степени сходная ситуация складывается и при исследовании нуклеиновых кислот (как мишеней) других живых форм.

Дополнительные требования при выделении ДНК и РНК вносит высокая чувствительность ПЦР, для которой необходимо полное исключение перекрестного загрязнения образцов. Другим важным моментом является массовость проведения ПЦР-анализов и, следовательно, необходимость одновременной экстракции нуклеиновых кислот из большого числа образцов. При этом чистота выделенных препаратов не должна ингибировать ферментативные и прочие процессы, происходящие при ПЦР, включая обратную транскрипционную ПЦР (ОТ-ПЦР) и отжиг праймеров. Если еще какой-либо единичный образец экстрагированной ДНК до требуемого состояния может быть очищен индивидуально относительно легко, то при большом их числе это становится уже некоторой проблемой. Поэтому на сегодняшний день предложено немало различных способов выделения и одновременной очистки нуклеиновых кислот с учетом источников,

из которых происходит выделение.

Очень грубо методы выделения нуклеиновых кислот можно разделить на экстракцию в растворе и на твердофазную экстракцию. Экстракция в растворе в своем классическом варианте основана на солевой солиubilлизации нуклеиновых кислот в присутствии подходящего ионного детергента (обычно додецилсульфата натрия), сопровождаемой фенол/хлороформной депротеинизацией. Довольно широко распространен метод экстракции с применением бромида цетилтриметиламмония, впервые предложенного фактически еще в доПЦРные времена [Doyle J.J., Doyle J.L., 1987], и для которого сейчас существует не менее дюжины вариаций для выделения нуклеиновых кислот конкретно для ПЦР (для обзора см. Demeke, Jenkins, 2010). Твердофазная экстракция, при которой могут использоваться или частицы силикагеля, или магнитные частицы, покрытые соответствующими группами, оказалась пригодной для автоматизации процесса выделения ДНК или РНК, и в настоящее время целым рядом фирм выпускаются роботы-экстракторы нуклеиновых кислот. Многие фирмы выпускают специально предназначенные для исследуемых образцов разного происхождения, будь то бактерии, растения, кровь или какие другие объекты, уже готовые наборы для экстракции ДНК и РНК как вручную, так и с помощью автоматических экстракторов.

Поскольку процесс выделения нуклеиновых кислот требует отдельного внимательного рассмотрения, то здесь придется ограничиться лишь ссылками на отдельные оригинальные работы главным образом последних лет, в которых проводилось сравнение различных ручных и автоматических методов экстракции нуклеиновых кислот, в том числе с использованием разных платформ [Straub et al., 1995; Arnal et al., 1999; McOrist et al., 2002; Suenaga, Nakamura, 2005; Costello, Schumm, 2006; Huggett et al., 2008; Bonot et al., 2010; Viltrop et al., 2010; Castella et al., 2011; Pontiroli et al., 2011; Stangegaard et al., 2011; Kosch, Summers, 2012; Phillips et al., 2012; Verheyen et al., 2012; Wang et al., 2012 и др.], а также ссылками на некоторые обзорные статьи [Tan, Yip, 2009; Demeke, Jenkins, 2010; Boesenberg-Smith et al., 2012]. Можно лишь заметить, что ввиду относительной массовости применения метода ПЦР в научных исследованиях и большого числа проводимых с помощью ПЦР диагностических анализов, прослеживается общая тенденция, направленная на максимальное упрощение/удешевление методов выделения нуклеиновых кислот, однако при этом должны обеспечиваться определенная нативность

препаратов и необходимая чистота, исключая ингибирование ПЦР.

#### **Ингибиторы ПЦР, привносимые с препаратами нуклеиновых кислот, и некоторые способы их удаления**

Ингибиторами ПЦР могут выступать соединения различной природы, и не для всех влияние на процесс амплификации до конца выяснено. Причем сведения подчас противоречивы. Так, случается, разные авторы высказывают различные предположения о механизмах ингибирования ПЦР одним и тем же соединением.

Практически все главные компоненты реакционной смеси ПЦР (ДНК-полимераза, праймеры, дНТФ, сама исследуемая/анализируемая ДНК) подвержены воздействию ингибиторов разных классов. Но все же считается, что главным механизмом действия многих ингибиторов является их связывание с ДНК-полимеразой и блокирование или ухудшение работы данного фермента. Вероятно, имеет место связывание некоторых веществ с фрагментами нуклеиновых кислот или с самими олигонуклеотидными праймерами, затрудняющее как отжиг последних, так и движение ДНК-полимеразы по такой не совсем нативной матрице. Связывание некоторыми ингибиторами ионов магния также приводит к блокированию работы фермента. Нельзя исключать и другие механизмы, мешающие процессу амплификации, хотя они менее очевидны. Как бы там ни было, вопросам ингибирования ПЦР всегда уделялось достаточно серьезное внимание, и опубликовано большое число обзоров на эту тему [Wilson, 1997; Radstrom et al., 2004; Demeke, Jenkins, 2010; Maurer, 2011; Alaeddini, 2012; Schrader et al., 2012 и др.] и огромное множество экспериментальных статей, среди которых немало чисто методических, часть из которых ниже будет процитирована. Особо следует отметить буквально единичные обзорные статьи отечественных авторов [Мавзютов и др., 2003; Творогова, Гушин, 2006], в которых сделан довольно подробный анализ имеющейся на тот момент литературы, посвященной ингибированию ПЦР.

Самое большое число реакций амплификации проводится с образцами, выделенными из различных тканей и жидкостей человека, в том числе из мокроты, а также из экскрементов. Причем, в таких препаратах нуклеиновых кислот целевые мишени могут принадлежать, помимо самого человека, организмам разных уровней генетической сложности (вирусам, бактериям, простейшим, грибам, червям, прочим паразитам). В зависимости от берущихся в анализ

образцов попутно выделяются присущие им те или иные ингибиторы ПЦР, и среди них гем-содержащие вещества - билирубин, гематин, гемоглобин и миоглобин, а также меланин, желчные кислоты, полисахариды, полифенолы, мочевины, коллаген, протеазы, ДНК-связывающие белки, гепарин, добавляемый для предотвращения свертывания крови, и пр. Фактически те же ингибиторы сопровождают нуклеиновые кислоты, выделенные из других животных объектов.

Иным составом представлены ингибиторы ПЦР при амплификации нуклеиновых кислот, выделенных из растительных тканей. Причем, помимо растений, это могут быть образцы нуклеиновых кислот также вирусной, бактериальной или грибной природы. Точнее, они могут быть мишенями, поскольку при экстракции нуклеиновых кислот этих организмов при их нахождении в растениях основное количество препарата будет неизбежно принадлежать растительной ДНК или РНК. Для многих растений характерно довольно значительное содержание веществ вторичного происхождения (различные пигменты, полисахариды, полифенолы, танины и пр.), оказывающих отрицательное воздействие на протекание ПЦР.

Весьма сильными ингибиторами ПЦР служат гуминовые и фульвовые кислоты почв, попадающие в препараты нуклеиновых кислот при их экстракции из натуральных образцов почвенных бактерий, вирусов, прочих мельчайших живых организмов. Гуминовые и фульвовые кислоты также являются серьезными загрязнителями древней ДНК из костных останков, поскольку при нахождении последних в земле они фактически пропитываются этими кислотами.

При исследовании пищевых техногенных продуктов с помощью ПЦР на предмет загрязнения бактериями или вирусами и предполагаемом ингибировании этой реакции теми или иными веществами необходимо учитывать исходное сырье с тем, чтобы применить особые условия амплификации или выбрать способ экстракции нуклеиновых кислот и их последующей очистки. Например, молочные продукты содержат значительное количество кальция, который может конкурировать с магнием при взаимодействии последнего с ДНК-полимеразой, и простое увеличение в реакционной смеси количества подходящей ДНК-полимеразы и ионов магния может снизить или полностью ликвидировать эффект ингибирования. Так, при обнаружении опасного микроорганизма *Listeria monocytogenes* в молоке было отмечено ингибирование ПЦР, вызванное ионами кальция, купировать которое

оказалось возможным путем повышения концентрации  $MgCl_2$  [Bickley et al., 1996].

В ряде работ отмечается, что излишне высокая концентрация фермента обратной транскриптазы может приводить к ингибированию последующей ПЦР [Fehlmann et al., 1993; Suslov, Steindler, 2005], причем в последней работе говорится, что такое ингибирование ведет к завышенному подсчету эффективности процесса амплификации, что для количественной ПЦР недопустимо, и предлагаются меры по исключению такого эффекта. Отмечается супрессия ПЦР, вызванная слишком высокой концентрацией РНК [Pikaart, Villenponteau, 1993], причем показано, что предобработка препаратов ДНК РНКазой улучшала эффективность ПЦР [Yoon, Glawe, 1993]. Рибонуклеотид-ванадиевый комплекс, служащий в качестве ингибитора РНКазы при выделении РНК, вызывает ингибирование ПЦР, и для визуального контроля за его удалением из конечного препарата рекомендуется добавлять в фенол 8-оксихинолин, который в результате из оранжеватой приобретает черную окраску [Lau et al., 1993].

Всестороннее исследование ингибирования процесса ПЦР провели шведские авторы, столкнувшись с этой проблемой при идентификации в фекалиях бактерии *Helicobacter pylori*. В одной работе они предприняли попытку выяснить природу ингибирующей субстанции, и путем хроматографии на колонке с Ultrogel Ac44 установили, что это сложные полисахариды, скорее всего имеющие растительное происхождение [Monteiro et al., 1997]. Удаление таких ингибиторов было осуществлено с помощью двухфазной системы - полиэтиленгликоль 4000 / декстран 40, где в полиэтиленгликольной фазе преимущественно собирались ингибиторы ПЦР, а декстрановую фазу непосредственно брали в амплификацию, поскольку предварительно до добавления анализируемых препаратов в двухфазную систему их кипятили в течение 10 мин [Lantz et al., 1997]. Несколько позже ими были применены иные подходы для преодоления ингибирования ПЦР при аналогичных анализах. Так, было замечено, что двухдневная диета без растительной пищи дает материал, не содержащий ингибиторов ПЦР, но без соблюдения диеты при их наличии, воспользовавшись ранее предложенным другим исследователем способом очистки ДНК от ингибиторов ПЦР с помощью диффузии [Moreira, 1998] они для удаления использовали сходные агарозные блоки, в которые заключали выделенную тотальную ДНК, из которых в течение ночи вымывали ингибирующие примеси, имеющие меньшие молекулярные массы [Monteiro et al., 2001]. В другой статье теми же авторами

предварительно с помощью иммуномагнитной сепарации с антителами, специфичными к *H. pylori*, были изолированы данные бактерии, из которых затем уже выделялась ДНК для амплификации [Monteiro et al., 2001a]. Такой же подход был применен ранее другими авторами для амплификации из фекалий ДНК сальмонелл [Fluit et al., 1995]. Отмечено также ингибирование ОТ-ПЦР вирусной РНК SFV при анализе фекалий у детей, причем оно менялось с возрастом ребенка и у младенцев отсутствовало, что напрямую связано с типом кормления и диеты [Oikarinen et al., 2009].

Проведенный анализ различных веществ полисахаридной природы показал, что многие из них не оказывают ингибирующего действия на ПЦР, однако декстран сульфат и один из видов камеди ингибировали реакцию, однако добавление в реакционную смесь по отдельности некоторых компонентов (Tween 20, диметилсульфоксид - ДМСО, полиэтиленгликоль 400) снимало эффект ингибирования [Demeke, Adams, 1992].

Отдельное внимание, видимо, стоит уделять лекарственным препаратам, применяемым для лечения больных, в плане потенциального ингибирования ПЦР при анализе препаратов нуклеиновых кислот, выделенных от таких пациентов. Так, было показано, что противовирусный препарат ацикловир, добавленный в реакционную смесь, начиная с некоторой концентрации ингибировал процесс амплификации, в результате чего авторы делают вывод, что к ложно-негативным результатам при диагностике больных, которым назначался данный препарат, следует относиться с осторожностью [Yedidag et al., 1996]. При проведении ОТ-ПЦР и обычной ПЦР был обнаружен ингибирующий эффект натриевой соли пентобарбитона - одного из барбитуратов, используемых для животных, впрочем такой отрицательный эффект преодолевался увеличением концентрации БСА в реакционной смеси [Hyun et al., 2004].

Часто добавляемый в мокроту для снижения ее вязкости для более удобного обращения во время выделения нуклеиновых кислот муколитический агент N-ацетил-L-цистеин сам служит сильным ингибитором амплификации, и потому в литературе содержатся рекомендации, как обойтись без данного соединения [Deneer, Knight, 1994]. Другими авторами для удаления ингибиторов ПЦР из препаратов нуклеиновых кислот из мокроты использовалась ионообменная смола [Amicosante et al., 1995]. Американским авторам не удалось амплифицировать ген 16S рРНК бактерий *E. coli*, присутствующих в культуре клеток крови, и в качестве ингибитора был выявлен

полианетосульфат натрия, служащий добавкой к питательной среде [Fredricks, Relman, 1998]. Они смогли ликвидировать ингибирование ПЦР путем экстракции нуклеиновых кислот бензиловым спиртом, применив несколько ранее предложенный метод выделения нуклеиновых кислот [Zhu et al., 1993].

В одной работе [Eckhart et al., 2000] было показано, что меланин ингибирует ПЦР, обратимо связываясь с ДНК-полимеразой, тогда как другие авторы предположили, что меланин связывается с ДНК и тем самым ухудшает течение амплификации [Price, Linge, 1999]. Японские авторы ранее высказали свою точку зрения, по которой Taq полимеразы связывается с двумя молекулами меланина, формируя неактивный комплекс [Yoshii et al., 1993]. Ингибирующее воздействие коллагена на ПЦР отмечается в работах разных авторов [Scholz et al., 1998; Kim et al., 2000]. Отмечено ингибирование ПЦР фитиновой (инозитгексафосфорной) кислотой при амплификации нуклеиновых кислот, выделенных из коровьих лепешек, которое удалось преодолеть с помощью фермента фитазы из гриба *Aspergillus niger* [Thornton, Passen, 2004].

Самый простой способ попробовать уменьшить или полностью ликвидировать ингибирование ПЦР некими веществами, присутствующими в исследуемых препаратах нуклеиновых кислот – это взять в реакцию амплификации значительно меньше материала, что и было применено канадскими авторами при детекции хламидий из образцов мочи с помощью ПЦР и ЛЦР (лигазной цепной реакции) [Chernesky et al., 1997]. В этом случае концентрация ингибирующей субстанции снижалась настолько, что становилась ниже порогового уровня, тормозящего амплификацию. Однако при таком подходе возрастает вероятность того, что исходное количество мишени может также перейти критическую черту, и по завершении энного числа циклов ПЦР не удастся уверенно регистрировать тем или иным методом целевой ампликон. Остается тогда увеличить число циклов, что также можно делать безгранично. Или применить вложенную (nested) ПЦР со вторым комплектом внутренних праймеров.

Другой возможностью проведения полноценной ПЦР является дополнительная очистка препаратов нуклеиновых кислот от ингибирующих примесей, что может быть достигнуто разными методами. Так, наиболее легким и простым подходом является переосаждение нуклеиновых кислот этанолом или изопропанолом, что было предложено, например, при удалении

полисахаридов из растительной ДНК [Michaels et al., 1994] и не указываемых ингибиторов ПЦР из препаратов ДНК, выделенных из древних костных останков [Hanni et al., 1995]. В другой работе, наоборот, предлагалось избирательное осаждение ингибирующих растительных полисахаридов высаливанием солью высокой концентрации [Fang et al., 1992]. Избирательное осаждение ДНК, выделенной из растения наперстянки, и освобождение ее от ингибирующих веществ предлагалось проводить осаждением полиэтиленгликолем 6000 [Agudo et al., 1995].

Дополнительной фенол-хлороформной депротеинизации (экстракции) в присутствии бромистого этидия с последующей концентрацией водной фазы в микроконцентраторе оказалось достаточно для удаления ингибиторов ПЦР из ДНК, выделенной из старых костных образцов возрастом около 1500 лет [Hall et al., 1995]. Предложенный метод выделения и одновременной очистки древней разновозрастной ДНК (от 2 до 5200 лет) путем вхождения ДНК под действием электрического тока при градиенте напряжения 7В/см непосредственно из измельченных костных и мышечных образцов в гель с последующей экстракцией ДНК уже из геля по эффективности удаления ингибиторов ПЦР превосшел параллельно проводимое выделение ДНК из этих же образцов с помощью силикагеля [Bachmann et al., 2000]. Оригинальный старт ПЦР был предложен для преодоления ингибирования амплификации криминалистических образцов ДНК из пятен крови, костей, волос, прочих тканей, заключающийся в так называемом «горячем замачивании» при 94°C, длящемся вместо обычных 2 мин целых полчаса [Ruano et al., 1992]. По уверению авторов, такой необычный старт ПЦР снимал эффект ингибирования ПЦР гемоглобином, тогда как при обычной ПЦР амплификация с этими образцами не происходила.

В модельном эксперименте с использованием большого числа потенциальных ингибиторов ПЦР (желчные кислоты, коллаген, гематин, гуминовые кислоты, индиго, меланин, танины, мочевины) было показано, что очистка с помощью специального набора NucleoSpin® DNA Clean-Up XS путем сорбции ДНК на частицах силикагеля приводила к исчезновению ингибирования ПЦР [Faber et al., 2013]. Удаление из препаратов ДНК сильного ингибитора ПЦР - гуминовых кислот, продемонстрировано с использованием специального сорбента - нерастворимого полимера фирмы Supelco (США), поставляемого под торговой маркой Supelite DAX-8 [Schriewer et al., 2011]. Для успешной амплификации препаратов ДНК из мочи и удаления

ингибиторов ПЦР потребовалась сорбция ДНК на стеклянных микрошариках [Buffone et al., 1991]. Успешное удаление разных классов ингибиторов ПЦР было показано с помощью гель-фильтрации [Tsai, Olson, 1992; Miller, 2001; Sorensen et al., 2003], активированного древесного угля [Abolmaaty et al., 2007], ионообменной хроматографии [Akane et al., 1993; Poli et al., 1993; Goodyear et al., 1994]. Очистить выделяемую из почвенных образцов ДНК от гуминовых кислот удалось при помощи химической флокуляции сульфатом алюминия [Braid et al., 2003; Dong et al., 2006]. Оригинальный способ очистки от ингибиторов ПЦР был применен для препаратов из крови, плазмы, мочи, заключающийся в приготовлении несмешивающихся фаз, одна из которых - гидрофобная, и проводке через нее парамагнитных частиц с последующими промывками водой [Sur et al., 2010]. Достаточно простой способ преодоления ингибирования ПЦР (Taq полимеразы из *Thermus aquaticus*) был предложен группой американских авторов [Bourke et al., 1999]. Он заключался в обработке/промывке щелочью (0,4М NaOH) препаратов нуклеиновых кислот в Microcon-100 концентраторе, в результате чего ингибиторы вымывались, а ДНК после нейтрализации становилась пригодной для амплификации.

При описании разных примеров ложно-негативной ПЦР неким особняком стоит работа американских авторов, обнаруживших ингибирование ПЦР точечной мутацией Т→С (транзицией Т31340С в гене фактора связывания крови IX человека), расположенной за 84 нуклеотида от места отжига одного из праймеров [Liu et al., 1997]. Тщательный анализ результатов ПЦР с использованием разнообразных праймерных комплектов, а также разных ДНК-полимераз не позволил им прийти к какому-либо заключению о причине такого ингибирования, причем возможная вторичная структура данного участка никак повлиять не могла, поскольку отсутствовала. Хотя во введении мы упоминали, что в данной статье не будут рассматриваться ситуации, приведшие к ложно-негативной ПЦР, вызванные изменениями нуклеотидных последовательностей, здесь иной случай, поскольку произошедшая мутация находится далеко от мест отжига праймеров и не может влиять на полноту их спаривания с матрицей.

#### Способы контроля за ложно-негативными результатами в ПЦР

Довольно часто встречающиеся случаи ложно-негативной ПЦР и проблемы, ими вызываемые, потребовали практически обязательного применения в научных

исследованиях и тем более в ДНК-диагностике уже упоминавшихся выше положительных контролей в ПЦР для исключения ложно-негативных результатов. Так, в одной работе была сконструирована последовательность, на которой отжигались те же праймеры, что и для основной ПЦР, но размер амплифицируемого фрагмента был сделан меньшим путем удаления с помощью подходящей рестрикционной эндонуклеазы части исходного ампликона с последующим лигированием образовавшихся фрагментов с целью достижения различий в их подвижности при разделении гель-электрофорезом [Pallen et al., 1992]. По этой же причине также несколько уменьшенного размера контрольные ампликоны создали другие авторы [Ballagi-Pordany, Belak, 1996]. Желая, чтобы целевой и контрольный ампликоны имели близкие размеры, что, по мнению еще одних авторов, способствует сходной эффективности амплификации, были сконструированы последовательности, отличающиеся (при условии сохранения одинаковых последовательностей для мест отжига праймеров) своими центральными частями, для детекции которых после завершения гель-электрофореза в блот-гибридизации использовались соответствующие радиоактивно-меченные зонды [Cone et al., 1992]. В то время ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ), в которой весьма широко применяются варианты детекции амплификации с использованием гибридационных проб, еще не существовала. Однако после появления ПЦР-РВ экспериментаторы не могли обойти стороной такой важный вопрос как ложно-негативная ПЦР, и для этого передового метода были разработаны специальные позитивные контроли, в том числе, на основе гибридационной TaqMan-системы<sup>5</sup> [Hartman et al., 2005]. Стала вестись количественная оценка уровней ингибирования ПЦР, включая организацию разнообразных модельных экспериментов [Nolan et al., 2005; Tichopad et al., 2005; Kontantinis et al., 2006; Kern et al., 2010; Schneider et al., 2009; Opel et al., 2010; Ellison et al., 2011]. В одной работе для точной количественной оценки уровня ингибирования ПЦР с помощью внутреннего положительного контроля была применена цифровая ПЦР на платформе OpenArray<sup>6</sup> фирмы Biotrove, Inc. (США) [van Doorn

<sup>5</sup> Различные способы детекции ампликонов с помощью ПЦР-РВ подробно рассмотрены нами ранее [Бикбулатова и др., 2012].

<sup>6</sup> В настоящее время эта система амплификации с помощью цифровой ПЦР поставляется фирмой Life Technologies (США) в виде двух моделей - OpenArray и QuantStudio.



et al., 2009].

Относительно недавно предложен новый довольно простой способ оценки содержания ингибиторов в выделенных препаратах нуклеиновых кислот [Rock et al., 2010]. Метод основан на флуоресцентной спектроскопии экстрагированных образцов, возбуждаемых разными длинами волн, и последующей детекции соответствующей эмиссии с помощью люминесцентного спектрометра. Авторы утверждают, что по соотношению 3D профилей можно предсказать, будет ли происходить ингибирование ПЦР при амплификации конкретного образца.

#### Усилители процесса амплификации

Резонно предположить, что раз есть ингибиторы ПЦР, то могут быть и усилители этого процесса. И такие соединения действительно есть, причем часть из них изначально входит в состав реакционной смеси. Можно усилить процесс амплификации хорошо работающей ДНК-полимеразой, к тому же увеличив количество последней. Так, весьма простой способ преодолеть ингибирование ПЦР заключается в увеличении в реакционной смеси количества Taq полимеразы, и как показано хорватскими авторами, амплификация в этом случае происходит, невзирая на наличие ингибирующих количеств гуминовых кислот [Sutlovic et al., 2005]. Другим компонентом ПЦР, присутствие которого в увеличенной концентрации способно снимать эффект ингибирования, является БСА [Akane et al., 1994; Hyun et al., 2004; Rohland, Hofreiter, 2007], причем в работе последних авторов БСА позволил протекать амплификации древней ДНК. Помимо БСА для преодоления ингибирования ПЦР было предложено добавлять в реакционную смесь и другой белок, связывающийся с одноцепочечной ДНК - gp32 фага T4 [Kreader, 1996].

Усилителем накопления целевых ампликонов в ПЦР служит хлорид тетраметиламмония [Hung et al., 1990; Chevet et al., 1995; Kovarova, Draber, 2000]. Во многих статьях отмечается, что такие вещества, дополнительно вносимые в реакционную смесь, как бетаин, ДМСО (вместе или поодиночке), заметно усиливают амплификацию целевых продуктов [Sarkar et al., 1990; Pomp, Medrano, 1991; Varadaraj, Skinner, 1994; Baskaran et al., 1996; Sidhu et al., 1996; Weissensteiner, Lanchbury, 1996; Hengen, 1997; Henke et al., 1997; Chakrabarti, Schutt, 2001; Kang et al., 2005; Musso et al., 2006; Ralser et al., 2006]. Сходную функцию выполняют низкомолекулярные сульфоны и другие сульфоксиды [Chakrabarti, Schutt, 2001a; 2002], а также гомоэктоин [Schnoor et al., 2004]. Для

амплификации *L.monocytogenes* для снятия проблемы ингибирования ПЦР в реакционную смесь добавляли Tween 20 [Simon et al., 1996]. Включение поливинилпирролидона в реакционную смесь способствовало амплификации препаратов ДНК, загрязненных полисахаридами [Koonjul et al., 1999], а 5% ацетамида способствовали амплификации древней ДНК [Reysenbach et al., 1992].

Детальное исследование влияния на эффективность ПЦР сразу 16 соединений было проведено шведскими авторами [Abu A-Soud, Radstrom, 2000]. Так, ими было изучено действие веществ различной природы: ацетамида, бетаина, БСА, декстрана 40, декстрана 500, ДМСО, формамида, глицерина, белка gp32, Нонидета Р-40, полиэтиленгликоля 400, полиэтиленгликоля 4000, ингибитора протеиназ, тетраметиламмония хлорида, Tween 20, Tween 80, применяемых в разных концентрациях с такими загрязнителями ПЦР, как кровь, фекалии и мясной гомогенат. Многие вещества из этого перечня оказали положительное воздействие (в разной степени) на протекание ПЦР с детекцией как по конечной точке, так и в ПЦР-РВ. Однако при их совместном применении синергического эффекта отмечено не было. Несколько позднее было оценено использование 11 усилителей процесса амплификации в режиме реального времени видов *Helicobacter*, где ингибитором являлись желчные кислоты [Abu Al-Soud et al., 2005]. Среди таких усилителей как БСА, казеин, декстран 500, ДМСО, формамид, желатин, глицерин, Нонидет Р-40, тритон Х-100, Tween 20 и Tween 80 наибольшее снятие эффекта ингибирования отмечено для казеина и формамида.

Помимо использования усилителей процесса амплификации в отдельных случаях весьма простым путем можно достичь улучшения результатов ПЦР за счет предварительного расщепления тотальной ДНК подходящей рестрикционной эндонуклеазой (разумеется, сайт узнавания которой отсутствует в последовательности ампликона), поскольку это позволит денатурировать ДНК более полно, что особенно важно для GC-богатых участков [Vazquez, Steinberg, 1999].

#### ДНК-полимеразы, нечувствительные к ингибиторам

Еще одним подходом к исключению ложно-негативной ПЦР является использование ДНК-полимераз, нечувствительных или в значительно меньшей степени чувствительных к загрязнениям реакционной смеси ингибиторами различной природы. Так, было показано, что использование

Tth полимеразы (*T.thermophilus*) вместо Taq полимеразы позволяет вести амплификацию даже тех образцов, которые в реакционной смеси содержат значительное количество крови (до 8%) [Panaccio, Lew, 1991], а также довольно высокие концентрации фенола [Katcher, Schwartz, 1994]. Меньшую чувствительность к ингибиторам ПЦР по сравнению с Taq полимеразой Tth полимеразы проявила при обнаружении вирусной РНК в мазках из носоглотки [Poddar et al., 1998]. При обнаружении вирусов во внутриглазной жидкости авторы [Wiedbrauk et al., 1995] столкнулись с проблемой ингибирования ПЦР и стали испытывать разные полимеразы. Оказалось, что Taq полимеразы весьма чувствительна к ингибированию, а Tth полимеразы и Tfi полимеразы (*T.flavus*) успешно справлялись с наработкой целевого продукта. Tth полимеразы оказались нечувствительны и к такому ингибитору ПЦР как миоглобин, тогда как Taq полимеразы им полностью ингибировались [Belec et al., 1998].

Сравнение чувствительности различных ДНК-полимераз к разным ингибиторам была исследована в целой серии статей группы авторов. Так, по их результатам по степени устойчивости к различным ингибиторам из фекалий и мяса Tth полимеразы превзошла Taq полимеразу, причем она оказалась и более «отзывчивой» на добавление ряда веществ, усиливающих процесс амплификации [Abu Al-Soud, Radstrom, 2000]. Несколько ранее также исследовались амплификационные свойства сразу девяти термостабильных ДНК-полимераз в присутствии различных ингибиторов [Abu Al-Soud et al., 1998]. Было обнаружено, что Taq полимеразы и ее укороченный вариант AmpliTaq Gold неспособны вести амплификацию в присутствии в реакционной смеси всего 0,004% цельной крови, тогда как HotTub полимеразы (из *Thermus ubiquitatus*), Tfi полимеразы, Pwo полимеразы из *Pyrococcus woesei*, рекомбинантная rTth полимеразы, Tli полимеразы из *Thermococcus litoralis* успешно амплифицировали целевой продукт даже в присутствии 20% крови. Ultima полимеразы из *Thermotoga maritima* оказались наименее чувствительной к находящимся в реакционной смеси ингибиторам из сыра, фекалий и мяса в виде их гомогенатов. Среди одиннадцати исследованных ДНК-полимераз только Tth полимеразы оказались нечувствительной к ингибированию амплификации иммуноглобулином G [Abu Al-Soud et al., 2000]. В своей следующей статье [Abu Al-Soud, Radstrom, 2001] эти авторы изучали ингибирование ПЦР лактоферрином и гемоглобином, и в этом случае амплификация происходила с rTth и Tli полимеразы, тогда как AmpliTaq Gold, Pwo и Ultima полимеразы

ингибировались в присутствии довольно низких концентраций этих компонентов крови. Позже этими же авторами проводилась оценка эффективности амплификации при диагностике *Helicobacter* в присутствии желчных кислот [Abu Al-Soud et al., 2005]. Было обнаружено, что наименее чувствительной к ингибиторам была Tth полимеразы, а Taq и Tfi полимеразы характеризовались наибольшей чувствительностью.

Три ДНК полимеразы на предмет чувствительности к ингибиторам из скелетных останков были испытаны в другой работе [Eilert, Foran, 2009]. Было показано, что и Taq, и Tth полимеразы оказались заметно чувствительнее к примесям, чем Tfi полимеразы. В серии статей шведских авторов [Hedman et al., 2009; 2010; 2011] было продемонстрировано превосходство новых термостабильных ДНК-полимераз с увеличенной активностью (Bio-X-Act Short, ExTaq Hot Start, PicoMaxx, к тому же еще более успешно работающих в смесях друг с другом) производства разных фирм над часто используемой в криминалистических исследованиях AmpliTaq Gold полимеразой.

Несмотря на то, что Tth полимеразы, как видно из изложенного выше, нечувствительна ко многим ингибиторам ПЦР, она имеет немало других сдерживающих ее широкое использование серьезных недостатков, которые будут описаны в готовящейся статье по термостабильным ДНК-полимеразам.

Более кардинальное решение уменьшить чувствительность ДНК-полимераз к ингибиторам было предложено группой авторов [Kermeckchiev et al., 2009; Zhang et al., 2010] из американской фирмы DNA Polymerase Technology, Inc. ([www.klentag.com](http://www.klentag.com)). Ими были произведены генно-инженерные манипуляции, результатом которых стали замена 708 кодона (E708W) и укорочение N-конца фермента, сделавшие новые ДНК-полимеразы минимально чувствительными к различным ингибиторам. Под торговыми именами OmniTaq и Omni KlenTaq данные ферменты поставляются вышеупомянутой фирмой.

Не сообщаемые изменения, произведенные генно-инженерным путем методами молекулярной эволюции<sup>7</sup> над термостабильной ДНК-полимеразой, позволили международной (США/ЮАР) фирме Кара Biosystems ([www.kapabiosystems.com](http://www.kapabiosystems.com)) создать целый ряд ферментов с уникальными свойствами (увеличенная скорость работы, повышенная точность построения новых цепей, увеличенная

<sup>7</sup> Обзор методов молекулярной эволюции проведен нами ранее [Бикбулатова и др. 2009].

процессивность, сниженная чувствительность к разным ингибиторам и др.). Среди таких новых ферментов этой фирмой производится Кара Blood ДНК-полимераза, способная амплифицировать ДНК из цельной, замороженной или высушенной крови. В России дистрибьютором фирмы Кара Biosystems является отечественная компания Кембио ([www.chembio.ru](http://www.chembio.ru)).

Также методами молекулярной эволюции с помощью одного из вариантов ДНК-шаффлинга международная группа авторов создала серию новых термостабильных ДНК-полимераз [Baar et al., 2011]. Для перетасовки участков ДНК-полимеразы и создания новых химерных форм ферментов ими были взяты восемь ДНК-полимераз из разных видов рода *Thermus* и одна ДНК-полимераза из довольно близкого рода *Deinococcus*. В результате проведенной работы был отобран вариант ДНК-полимеразы, получивший обозначение 2D9, характеризующийся наименьшей чувствительностью к разным ингибиторам, среди которых были гуминовые и фульвовые кислоты. Секвенирование полученного клона показало, что в нем представлены фрагменты, по крайней мере, четырех ДНК-полимераз - из микроорганизмов *T.thermophilis*, *T.oshinai*, *T.brokianus*, *T.aquaticus*. В заключение своей статьи авторы отмечают, что, возможно, потребуются варианты 2D9 ДНК-полимеразы, рассчитанные на горячий старт<sup>8</sup>, а также, что методами молекулярной эволюции можно создать и новые ДНК-полимеразы с еще более ценными свойствами.

### Заключение

Завершая данную статью стоит, видимо, заметить, что в настоящее время благодаря чрезвычайно широкому применению метода ПЦР амплификации подвергаются нуклеиновые кислоты, выделенные из очень разных объектов, среди которых немало тех, что содержат экстрагируемые вместе с ДНК и/или РНК различные ингибирующие протекание ПЦР примеси, что влечет за собой необходимость учитывать такие моменты и использовать внутренние положительные контроли, подтверждающие достоверность реакции. Причем, внутренние положительные контроли, приготовленные в условиях, исключающих наличие ингибиторных субстанций, фактически способны лишь свидетельствовать о пригодности праймеров, наличии у используемого фермента остаточной (достаточной) ДНК-полимеразной активности,

правильности выбранного режима амплификации и о работоспособности ДНК-термоциклера. Возможно, следует брать за правило, дублируя один из анализируемых натуральных образцов (с присущими ему ингибиторами) добавлять в него контрольную матрицу (для тех же праймеров и лучше близкого, но все же несколько отличающегося размера и причем в высококонцентрированном виде, не допуская разбавления возможных ингибиторов) и делать такой образец вторым положительным контролем, амплификация или неамплификация нуклеиновых кислот в котором (специфичная) будет свидетельствовать о неингибировании или ингибировании ПЦР соответственно.

### 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. 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 // Вестник Башкирского университета, 2012, Т. 17. С. 59-67.
3. Мавзютов А.Р., Бондаренко В.М., Латкин А.Т. Ингибиторы полимеразной цепной реакции // Журн. микробиол. 2003. №3. С.93-98.
4. Магданов Э.Г., Гарафутдинов Р.Р., Чемерис А.В. Микрожидкостная ПЦР // Вестник Башкирского университета. 2013. Т. 18. в печати.
5. Творогова М.Г., Гуцин А.Е. ПЦР исследования в лабораторной диагностике: вопросы обеспечения качества // Клин. лаб. диагн. 2006. №12. С.38-41.
6. Чемерис А.В., Магданов Э.Г., Гарафутдинов Р.Р., Вахитов В.А. Как исключить появление ложно-положительных результатов при проведении полимеразной цепной реакции // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии. 2012. Т.8. С.31-42.
7. Чемерис Д.А., Магданов Э.Г., Машков О.И., Гарафутдинов Р.Р., Чемерис А.В. ПЦР с отложенным (горячим или задержанным) стартом // Биомика. 2011. Т.2., С.1-8.
8. Abolmaaty A., Gu W., Witkowsky R., Levin R.E. The use of activated charcoal for the removal of PCR inhibitors from oyster samples // J. Microbiol. Methods. 2007. V. 68. P. 349-352.
9. Abu Al-Soud W., Rådström P. Capacity of nine

<sup>8</sup> Обзорная статья, посвященная различным вариантам отложенного или горячего старта в ПЦР, опубликована нами ранее [Чемерис и др., 2011].

- thermostable DNA polymerases To mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting samples // *Appl. Environ. Microbiol.* 1998. V. 64. P. 3748-3753.
10. Akane A., Matsubara K., Nakamura H., Takahashi S., Kimura K. Identification of the heme compound copurified with deoxyribonucleic acid (DNA) from bloodstains, a major inhibitor of polymerase chain reaction (PCR) amplification // *J. Forensic Sci.* 1994. V. 39. P. 362-372.
  11. Akane A., Shiono H., Matsubara K., Nakamura H., Hasegawa M., Kagawa M. Purification of forensic specimens for the polymerase chain reaction (PCR) analysis // *J. Forensic Sci.* 1993. V. 38. P. 691-701.
  12. Alaeddini R. Forensic implications of PCR inhibition--A review // *Forensic Sci. Int. Genet.* 2012. V. 6. P. 297-305.
  13. Al-Soud W.A., Jönsson L.J., Rådström P. Identification and characterization of immunoglobulin G in blood as a major inhibitor of diagnostic PCR // *J. Clin. Microbiol.* 2000. V. 38. P. 345-350.
  14. Al-Soud W.A., Rådström P. Effects of amplification facilitators on diagnostic PCR in the presence of blood, feces, and meat // *J. Clin. Microbiol.* 2000. V. 38. P. 4463-4470.
  15. Al-Soud W.A., Rådström P. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells // *J. Clin. Microbiol.* 2001. V. 39. P. 485-493.
  16. Al-Soud WA, Ouis IS, Li DQ, Ljungh S, Wadström T. Characterization of the PCR inhibitory effect of bile to optimize real-time PCR detection of *Helicobacter* species // *FEMS Immunol Medto Microbiol.* 2005. V. 44. P. 177-182
  17. Amicosante M., Richeldi L., Trenti G., Paone G., Campa M., Bisetti A., Saltini C. Inactivation of polymerase inhibitors for *Mycobacterium tuberculosis* DNA amplification in sputum by using capture resin // *J. Clin. Microbiol.* 1995. V. 33. P. 629-630.
  18. Arnal C., Ferré-Aubineau V., Besse B., Mignotte B., Schwartzbrod L., Billaudel S. Comparison of seven RNA extraction methods on stool and shellfish samples prior to hepatitis A virus amplification // *J. Virol. Methods.* 1999. V. 77. P. 17-26.
  19. Baar C., d'Abbadie M., Vaisman A., Arana M.E., Hofreiter M., Woodgate R., Kunkel T.A., Holliger P. Molecular breeding of polymerases for resistance to environmental inhibitors // *Nucleic Acids Res.* 2011. V. 39. e51.
  20. Bachmann L., Scholz M., Broghammer M., Giddings I., Pusch C.M. Voltage-induced release of nucleic acids from palaeontological samples // *Electrophoresis.* 2000. V. 21. P. 1488-1492.
  21. Ballagi-Pordány A., Belák S. The use of mimics as internal standards to avoid false negatives in diagnostic PCR // *Mol. Cell Probes.* 1996. V. 10. P. 159-164.
  22. Baskaran N., Kandpal R.P, Bhargava A.K, Glynn M.W., Bale A., Weissman S.M. Uniform amplification of a mixture of deoxyribonucleic acids with varying GC content // *Genome Res.* 1996. V. 6. P. 633-638.
  23. Bélec L., Authier J., Eliezer-Vanerot M.C., Piédouillet C., Mohamed A.S., Gherardi R.K. Myoglobin as a polymerase chain reaction (PCR) inhibitor: a limitation for PCR from skeletal muscle tissue avoided by the use of *Thermus thermophilus* polymerase // *Muscle Nerve.* 1998. V. 21. P. 1064-1067.
  24. Bickley J., Short J.K., McDowell D.G., Parkes H.C. Polymerase chain reaction (PCR) detection of *Listeria monocytogenes* in diluted milk and reversal of PCR inhibition caused by calcium ions // *Lett. Appl. Microbiol.* 1996. V. 22. P. 153-158.
  25. Boesenberg-Smith K.A., Pessarakli M.M., Wolk D.M. Assessment of DNA Yield and Purity: an overlooked detail of PCR troubleshooting // *Clin. Microbiol. Newsletter.* 2012. V. 34. P. 1-6.
  26. Bonot S., Courtois S., Block J.C., Merlin C. Improving the recovery of qPCR-grade DNA from sludge and sediment // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010. V. 87. P. 2303-2311.
  27. Bourke M.T., Scherzinger C.A., Ladd C., Lee H.C. NaOH treatment to neutralize inhibitors of Taq polymerase // *J. Forensic. Sci.* 1999. V. 44. P. 1046-1050.
  28. Braid M.D., Daniels L.M., Kitts C.L. Removal of PCR inhibitors from soil DNA by chemical flocculation // *J. Microbiol. Methods.* 2003. V. 52. P. 389-393.
  29. Buffone G.J., Demmler G.J., Schimbor C.M., Greer J. Improved amplification of cytomegalovirus DNA from urine after purification of DNA with glass beads // *Clin. Chem.* 1991. V. 37. P. 1945-1949.
  30. Castella V., Kummer D., Gehrig C., Hall D. DNA extraction using the QIASymphony: Evaluation of PCR inhibitor removal // *Forensic Sci. Int. Genet.* 2011. V. 3. e69-e70.
  31. Chakrabarti R., Schutt C.E. Novel sulfoxides facilitate GC-rich template amplification // *Biotechniques.* 2002. P. 32. P. 866, 868, 870-872, 874.
  32. Chakrabarti R., Schutt C.E. The enhancement of PCR amplification by low molecular-weight

- sulfones // *Gene*. 2001. V. 274. P. 293-298.
33. Chakrabarti R., Schutt C.E. The enhancement of PCR amplification by low molecular weight amides // *Nucleic Acids Res.* 2001. V. 29. P. 2377-2381.
  34. Chernesky M.A., Jang D., Sellors J., Luinstra K., Chong S., Castriciano S., Mahony J.B. Urinary inhibitors of polymerase chain reaction and ligase chain reaction and testing of multiple specimens may contribute to lower assay sensitivities for diagnosing *Chlamydia trachomatis* infected women // *Mol. Cell Probes*. 1997. V. 11. 243-249.
  35. Chevet E., Lemaître G., Katinka M.D. Low concentrations of tetramethylammonium chloride increase yield and specificity of PCR // *Nucleic Acids Res.* 1995. V. 23. P. 3343-3344.
  36. Cone R.W., Hobson A.C., Huang M.L. Coamplified positive control detects inhibition of polymerase chain reactions // *J. Clin. Microbiol.* 1992. V. 30. P. 3185-3189.
  37. Costello M.T., Schumm J.W. A single assay for human-specific quantification of less than 1 pg DNA and detection of the presence of PCR inhibitors in forensic samples // *Int. Congress Series*. 2006. V. 1288. P. 753-755.
  38. de Castillo Agudo L., Gavidia I., Pérez-Bermúdez P., Segura J. PEG precipitation, a required step for PCR amplification of DNA from wild plants of *Digitalis obscura* L. // *Biotechniques*. 1995. V. 18. P. 766-768.
  39. de Lomas J.G., Sunzeri F.J., Busch M.P. False-negative results by polymerase chain reaction due to contamination by glove powder // *Transfusion*. 1992. V. 32. P. 83-85.
  40. Demeke T., Adams R.P. The effects of plant polysaccharides and buffer additives on PCR // *Biotechniques*. 1992. V. 12. P. 332-334.
  41. Demeke T., Jenkins G.R. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits // *Anal Bioanal Chem*. 2010. V. 396. P. 1977-1990.
  42. Deneer H.G., Knight I. Inhibition of the polymerase chain reaction by mucolytic agents // *Clin. Chem*. 1994. V. 40. P. 171-172.
  43. Eckhart L., Bach J., Ban J., Tschachler E. Melanin binds reversibly to thermostable DNA polymerase and inhibits its activity // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2000. V. 271. P. 726-730.
  44. Eilert K.D., Foran D.R. Polymerase resistance to polymerase chain reaction inhibitors in bone\* // *J. Forensic Sci.* 2009. V. 54. P. 1001-1007.
  45. Ellison S.L., Emslie K.R., Kassir Z. A standard additions method reduces inhibitor-induced bias in quantitative real-time PCR // *Anal. Bioanal. Chem.* 2011. V. 401. P. 3221-3227.
  46. Faber K.L., Person E.C., Hudlow W.R. PCR inhibitor removal using the NucleoSpin(®) DNA Clean-Up XS kit // *Forensic Sci. Int. Genet.* 2013. V. 7. P. 209-213.
  47. Fan X.Y., Lü G.Z., Wu L.N., Chen J.H., Xu W.Q., Zhao C.N., Guo S.Q. A modified single-tube one-step product-enhanced reverse transcriptase (mSTOS-PERT) assay with heparin as DNA polymerase inhibitor for specific detection of RTase activity // *J. Clin. Virol.* 2006. V. 37. P. 305-312.
  48. Fang G., Hammar S., Grumet R. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA // *Biotechniques*. 1992. V. 13. P. 52-54, 56.
  49. Fehlmann C., Krapf R., Solioz M. Reverse transcriptase can block polymerase chain reaction // *Clin. Chem*. 1993. V. 39. P. 368-369.
  50. Foley C., O'Farrelly C., Meade K.G. Technical note: Comparative analyses of the quality and yield of genomic DNA from invasive and noninvasive, automated and manual extraction methods // *J. Dairy Sci.* 2011. V.94. P.3159-3165.
  51. Fredericks D.N., Relman D.A. Improved amplification of microbial DNA from blood cultures by removal of the PCR inhibitor sodium polyanetholesulfonate // *J. Clin. Microbiol.* 1998. V. 30. P. 2810-2816.
  52. Goodyear P.D., MacLaughlin-Black S., Mason I.J. A reliable method for the removal of co-purifying PCR inhibitors from ancient DNA // *Biotechniques*. 1994. V. 16. P. 232-235.
  53. Hall L.M., Slee E., Jones D.S. Overcoming polymerase chain reaction inhibition in old animal tissue samples using ethidium bromide // *Anal. Biochem.* 1995. V. 225. P. 169-172.
  54. Hänni C., Brousseau T., Laudet V., Stehelin D. Isopropanol precipitation removes PCR inhibitors from ancient bone extracts // *Nucleic Acids Res.* 1995. V. 23. P. 881-882.
  55. Hartman L.J., Coyne S.R., Norwood D.A. Development of a novel internal positive control for Taqman based assays // *Mol. Cell. Probes*. 2005. V. 19. P. 51-59.
  56. Hedman J., Dufva C., Noren L., Ansell C., Albinsson L., Ansell R. Applying a PCR inhibitor tolerant DNA polymerase blend in forensic DNA profiling // *Forensic Sci. Int. Genet.* 2011. V. 3. e349-e350.
  57. Hedman J., Nordgaard A., Dufva C., Rasmusson B., Ansell R., Rådström P. Synergy between DNA polymerases increases polymerase chain reaction inhibitor tolerance in forensic DNA analysis // *Anal. Biochem.* 2010. V. 405. P. 192-200.

58. Hedman J., Nordgaard A., Rasmusson B., Ansell R., Rådström P. Improved forensic DNA analysis through the use of alternative DNA polymerases and statistical modeling of DNA profiles // *Biotechniques*. 2009. V. 47. P. 951-958.
59. Hengen P.N. Optimizing multiplex and LA-PCR with betaine // *Trends Biochem. Sci.* 1997. V. 22. P. 225-226.
60. Henke W., Herdel K., Jung K., Schnorr D., Loening S.A. Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences // *Nucleic Acids Res.* 1997. V. 25. P. 3957-3958.
61. Herrera A., Cockell C.S. Exploring microbial diversity in volcanic environments: a review of methods in DNA extraction // *J. Microbiol. Methods*. 2007. V.70. P.1-12.
62. Huggett J.F., Novak T., Garson J.A., Green C., Morris-Jones S.D., Miller R.F., Zumla A.. Differential susceptibility of PCR reactions to inhibitors: an important and unrecognised phenomenon // *BMC Res Notes*. 2008. V. 1. P. 70.
63. Hung T., Mak K., Fong K. A specificity enhancer for polymerase chain reaction // *Nucleic Acids Res.* 1990. V. 18. P. 4953.
64. Hyun C., Filippich L.J., Hughes I. The inhibitory effect of pentobarbitone on reverse transcription-PCR // *J. Biochem. Biophys. Methods*. 2005. V. 62. P. 63-68.
65. Kang J., Lee M.S., Gorenstein D.G. The enhancement of PCR amplification of a random sequence DNA library by DMSO and betaine: application to in vitro combinatorial selection of aptamers // *J. Biochem. Biophys. Methods*. 2005. V. 64. P. 147-151.
66. Katcher H.L., Schwartz I. A distinctive property of Tth DNA polymerase: enzymatic amplification in the presence of phenol // *Biotechniques*. 1994. V. 16. P. 84-92.
67. Kermekchiev M.B., Kirilova L.I., Vail E.E., Barnes W.M. Mutants of Taq DNA polymerase resistant to PCR inhibitors allow DNA amplification from whole blood and crude soil samples // *Nucleic Acids Res.* 2009. V. 37. e40.
68. Kern M., Böhm S., Deml L., Wolf H., Reischl U., Niller H.H. Inhibition of Legionella pneumophila PCR in respiratory samples: a quantitative approach // *J. Microbiol. Methods*. 2009. V. 79. P. 189-193.
69. Kim S., Labbe R.G., Ryu S. Inhibitory effects of collagen on the PCR for detection of Clostridium perfringens // *Appl. Environ. Microbiol.* 2000. V. 66. P. 1213-1215.
70. Kodzius R., Xiao K., Wu J., Yi X., Gong X., Foulds I.G., Wen W. Inhibitory effect of common microfluidic materials on PCR outcome // *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2012. V. 161. P. 349-358.
71. Kontanis E.J., Reed F.A. Evaluation of real-time PCR amplification efficiencies to detect PCR inhibitors // *J. Forensic Sci.* 2006. V. 51. P. 795-804.
72. Koonjul P.K., Brandt W.F., Farrant J.M., Lindsey G.G. Inclusion of polyvinylpyrrolidone in the polymerase chain reaction reverses the inhibitory effects of polyphenolic contamination of RNA // *Nucleic Acids Res.* 1999. V. 27. P. 915-916.
73. Kosch T.A., Summers K. Techniques for minimizing the effects of PCR inhibitors in the chytridiomycosis assay // *Mol. Ecol. Resour.* 2012 Dec 14. (Epub ahead of print).
74. Kovárová M., Dráber P. New specificity and yield enhancer of polymerase chain reactions // *Nucleic Acids Res.* 2000. V. 28. E70.
75. Kreader C.A. Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein // *Appl. Environ. Microbiol.* 1996. V. 62. P. 1102-1106.
76. Lantz P-G., Matsson M., Wadstrom T., Rådström P. Removal of PCR inhibitors from human faecal samples through the use of an aqueous two-phase system for sample preparation prior to PCR // *J. Microbiol. Methods*. 1997. V. 28. P. 159-167.
77. Lau J.Y.N., Qian K-P., Wu P.C., Davis G.L. Ribonucleotide vanadyl complexes inhibit polymerase chain reaction // *Nucleic Acids Res.* 1999. V. 27. P. 915-916.
78. Liu Q., Thorland E.C., Sommer S.S. Inhibition of PCR amplification by a point mutation downstream of a primer // *Biotechniques*. 1997. V. 22. P. 292-4, 296, 298, passim.
79. Maurer J.J. Rapid detection and limitations of molecular techniques // *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 2011. V. 2. P. 259-279.
80. McCormack J.M., Sherman M.L., Maurer D.H. Quality control for DNA contamination in laboratories using PCR-based class II HLA typing methods // *Hum. Immunol.* 1997. V. 54. P. 82-88.
81. McOrist A.L., Jackson M., Bird A.R. A comparison of five methods for extraction of bacterial DNA from human faecal samples // *J. Microbiol. Methods*. 2002. V. 50. P. 131-139.
82. Michaels S.D., John M.C., Amasino R.M. Removal of polysaccharides from plant DNA by ethanol precipitation // *Biotechniques*. 1994. V. 17. P. 274-276.
83. Miller D.N. Evaluation of gel filtration resins for the removal of PCR-inhibitory substances from soils and sediments // *J. Microbiol. Methods*. 2001. V. 44. P. 49-58.
84. Monteiro L., Bonnemaïson D., Vekris A., Petry

- K.G., Bonnet J., Vidal R., Cabrita J., Mégraud F. Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model // *J. Clin. Microbiol.* 1997. V. 35. P. 995-998.
85. Monteiro L., Gras N., Megraud F. Magnetic immuno-PCR assay with inhibitor removal for direct detection of *Helicobacter pylori* in human feces // *J. Clin. Microbiol.* 2001. P. 39. P. 3778-3780.
86. Monteiro L., Gras N., Vidal R., Cabrita J., Mégraud F. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in human feces by PCR: DNA stability and removal of inhibitors // *J. Microbiol. Methods.* 2001. V. 45. P. 89-94.
87. Moreira D. Efficient removal of PCR inhibitors using agarose-embedded DNA preparations // *Nucleic Acids Res.* 1998. V. 26. P. 3309-3310.
88. Musso M., Bocciardi R., Parodi S., Ravazzolo R., Ceccherini I. Betaine, dimethyl sulfoxide, and 7-deaza-dGTP, a powerful mixture for amplification of GC-rich DNA sequences // *J. Mol. Diagn.* 2006. V. 8. P. 544-550.
89. Nolan T., Hands R.E., Ogunkolade W., Bustin S.A. SPUD: a quantitative PCR assay for the detection of inhibitors in nucleic acid preparations // *Anal. Biochem.* 2006. V. 351. P. 308-310.
90. Oikarinen S., Tauriainen S., Viskari H., Simell O., Knip M., Virtanen S., Hyöty H. PCR inhibition in stool samples in relation to age of infants // *J. Clin. Virol.* 2009. V. 44. P. 211-214.
91. Opel K.L., Chung D., McCord B.R. A study of PCR inhibition mechanisms using real time PCR // *J. Forensic Sci.* 2010. V. 55. P. 25-33.
92. Pallen M.J., Puckey L.H., Wren B.W. A rapid, simple method for detecting PCR failure // *PCR Methods and Application.* 1992. V. 2. P. 91-92.
93. Panaccio M., Lew A. PCR based diagnosis in the presence of 8% (v/v) blood // *Nucleic Acids Res.* 1991. V. 19. P. 1151.
94. Pao C.C., Hor J.J., Tsai P.L., Horng M.Y. Inhibition of in vitro enzymatic DNA amplification reaction by ultra-violet light irradiation // *Mol. Cell. Probes.* 1993. V. 7. P. 217-219.
95. Phillips K., McCallum N., Welch L. A comparison of methods for forensic DNA extraction: Chelex-100 and the QIAGEN DNA Investigator Kit (manual and automated) // *Forensic Sci. Int. Genet.* 2012. V. 6. P. 282-285.
96. Pikaart M.J., Villeponteau B. Suppression of PCR amplification by high levels of RNA // *Biotechniques.* 1993. V. 14. P. 24-25.
97. Poddar S.K., Sawyer M.H., Connor J.D. Effect of inhibitors in clinical specimens on Taq and Tth DNA polymerase-based PCR amplification of influenza A virus // *J. Med. Microbiol.* 1998. V. 47. P. 1131-1135.
98. Poli F., Cattaneo R., Crespiatico L., Nocco A., Sirchia G. A rapid and simple method for reversing the inhibitory effect of heparin on PCR for HLA class II typing // *PCR Methods Appl.* 1993. V. 2. P. 356-358.
99. Pomp D., Medrano J.F. Organic solvents as facilitators of polymerase chain reaction // *Biotechniques.* 1991. V. 10. P. 58-59.
100. Pontrolli A., Travis E.R., Sweeney F.P., Porter D., Gaze W.H., Mason S., Hibberd V., Holden J., Courtenay O., Wellington E.M.H. Pathogen quantitation in complex matrices: a multioperator comparison of DNA extraction methods with a novel assessment of PCR inhibition // *PLoS ONE.* 2011. V.6. E17916 (p.1-11)/
101. Price K., Linge C. The presence of melanin in genomic DNA isolated from pigmented cell lines interferes with successful polymerase chain reaction: a solution // *Melanoma Res.* 1999. V. 9. P. 5-9.
102. Rådström P., Knutsson R., Wolffs P., Lövenklev M., Löfström C. Pre-PCR processing: strategies to generate PCR-compatible samples // *Mol. Biotechnol.* 2004. V. 26. P.133-146.
103. Ralser M., Querfurth R., Warnatz H.J., Lehrach H., Yaspo M.L., Krobitsch S. An efficient and economic enhancer mix for PCR // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006. V. 347. P. 747-751.
104. Rapp D. DNA extraction from bovine faeces: current status and future trends // *J. Appl. Microbiol.* 2010. V.108. P.1485-1493.
105. Reysenbach A.L., Giver L.J., Wickham G.S., Pace N.R. Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction // *Appl. Environ. Microbiol.* 1992. V. 58. P. 3417-3418.
106. Rock C., Alum A., Abbaszadegan M. PCR inhibitor levels in concentrates of biosolid samples predicted by a new method based on excitation-emission matrix spectroscopy // *Appl. Environ. Microbiol.* 2010. V. 76. P. 8102-8109.
107. Rohland N., Hofreiter M. Comparison and optimization of ancient DNA extraction // *Biotechniques.* 2007. V. 42. P. 343-352.
108. Rossen L., Nørskov P., Holmstrøm K., Rasmussen O.F. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions // *Int. J. Food Microbiol.* 1992. V. 17. P. 37-45.
109. Ruano G., Pagliaro E.M., Schwartz T.R., Lamy K., Messina D., Gaensslen R.E., Lee H.C. Heat-soaked PCR: an efficient method for DNA amplification with applications to forensic

- analysis // *Biotechniques*. 1992. V. 13. P. 266-274.
110. Sarkar G., Kapelner S., Sommer S.S. Formamide can dramatically improve the specificity of PCR // *Nucleic Acids Res.* 1990. V. 18. P. 7465.
111. Schneider S., Enkerli J., Widmer F. A generally applicable assay for the quantification of inhibitory effects on PCR // *J. Microbiol. Methods*. 2009. V. 78. P. 351-353.
112. Schnoor M., Voss P., Cullen P., Böking T., Galla H.J., Galinski E.A., Lorkowski S. Characterization of the synthetic compatible solute homoectoine as a potent PCR enhancer // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004. V. 322. P. 867-872.
113. Scholz M., Giddings I., Pusch C.M. A polymerase chain reaction inhibitor of ancient hard and soft tissue DNA extracts is determined as human collagen type I // *Anal. Biochem.* 1998. V. 259. P. 283-286.
114. Schrader C., Schielke A., Ellerbroek L., Johne R. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal // *J. Appl. Microbiol.* 2012. V. 113. P. 1014-1026.
115. Schriewer A., Wehlmann A., Wuertz S. Improving qPCR efficiency in environmental samples by selective removal of humic acids with DAX-8 // *J. Microbiol. Methods*. 2011. V. 85. P. 16-21.
116. Sidhu M.K., Liao M.J., Rashidbaigi A. Dimethyl sulfoxide improves RNA amplification // *Biotechniques*. 1996. V. 21. P. 44-47.
117. Simon M.C., Gray D.I., Cook N. DNA Extraction and PCR Methods for the Detection of *Listeria monocytogenes* in Cold-Smoked Salmon // *Appl. Environ. Microbiol.* 1996. V. 62. P. 822-824.
118. Sørensen E., Hansen S.H., Eriksen B., Morling N. Application of thiopropyl sepharose 6B for removal of PCR inhibitors from DNA extracts of a thigh bone recovered from the sea // *Int. J. Legal. Med.* 2003. V. 117. P. 245-247.
119. Stangegaard M., Hjort B.B., Hansen T.N., Hansen A.J., Morling N. Automated extraction of DNA from clothing // *Forensic Sci. Int. Genet.* 2011. V. 3. e403-e404.
120. Straub T.M., Pepper I.L., Gerba C.P. Removal of PCR inhibiting substances in sewage amended soil // *Water science and Technology*. 1995. V. 31. P. 311-315.
121. Sturr M.G., Marquis R.E. Comparative acid tolerances and inhibitor sensitivities of isolated F-ATPases of oral lactic acid bacteria // *Appl. Environ. Microbiol.* 1992 V. 58. P. 2287-2291.
122. Suenaga E., Nakamura H. Evaluation of three methods for effective extraction of DNA from human hair // *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2005. V. 820. P. 137-141.
123. Sur K., McFall S.M., Yeh E.T., Jangam S.R., Hayden M.A., Stroupe S.D., Kelso D.M. Immiscible phase nucleic acid purification eliminates PCR inhibitors with a single pass of paramagnetic particles through a hydrophobic liquid // *J. Mol. Diagn.* 2010. V. 12. P. 620-628.
124. Suslov O., Steindler D.A. PCR inhibition by reverse transcriptase leads to an overestimation of amplification efficiency // *Nucleic Acids Res.* 2005. V. 33. e181.
125. Sutlović D., Definis Gojanović M., Andelinović S., Gugić D., Primorac D. Taq polymerase reverses inhibition of quantitative real time polymerase chain reaction by humic acid // *Croat. Med. J.* 2005. V. 46. P. 556-562.
126. Tan S.C., Yiap B.C. DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present // *J. Biomed Biotechnol.* 2009. V. 2009. ID 574398. 10p.
127. Thornton C.G., Passen S. Inhibition of PCR amplification by phytic acid, and treatment of bovine fecal specimens with phytase to reduce inhibition // *J. Microbiol. Methods*. 2004. P. 59. P. 43-52.
128. Tichopad A., Polster J., Pecen L., Pfaffl M.W. Model of inhibition of *Thermus aquaticus* polymerase and Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase by tea polyphenols (+)-catechin and (-)-epigallocatechin-3-gallate // *J. Ethnopharmacol.* 2005. V. 99. P. 221-227.
129. van Doorn R., Klerks M.M., van Gent-Pelzer M.P., Speksnijder A.G., Kowalchuk G.A., Schoen C.D. Accurate quantification of microorganisms in PCR-inhibiting environmental DNA extracts by a novel internal amplification control approach using Biotrove OpenArrays // *Appl. Environ. Microbiol.* 2009. V. 75. P. 7253-7260.
130. Varadaraj K., Skinner D.M. Denaturants or cosolvents improve the specificity of PCR amplification of a G + C-rich DNA using genetically engineered DNA polymerases // *Gene*. 1994. V. 140. P. 1-5.
131. Vázquez R., Steinberg M.L. Enhancement of PCRs by partial restriction digestion of genomic templates // *Biotechniques*. 1999. V. 26. P. 91-95.
132. Verheyen J., Kaiser R., Bozic M., Timmen-Wego M., Maier B.K., Kessler H.H. Extraction of viral nucleic acids: comparison of five automated nucleic acid extraction platforms // *J. Clin. Virol.* 2012. V. 54. P. 255-259.
133. Viltrop T., Krjutskov K., Palta P., Metspalu A. Comparison of DNA extraction methods for multiplex polymerase chain reaction // *Anal. Biochem.* 2010. V. 398. P. 260-262.



134. Wang X., Teng D., Tian F., Guan Q., Wang J. Comparison of three DNA extraction methods for feed products and four amplification methods for the 5'-junction fragment of Roundup Ready soybean // *J. Agric. Food Chem.* 2012. V. 60. P. 4586-4595.
135. Wang W., Wang H.B., Li Z.X., Guo Z.Y. Silicon inhibition effects on the polymerase chain reaction: a real-time detection approach // *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2006. V.77. P.28-34.
136. Weissensteiner T., Lanchbury J.S. Strategy for controlling preferential amplification and avoiding false negatives in PCR typing // *Biotechniques.* 1996. V. 21. P. 1102-1108.
137. Wiedbrauk D.L., Werner J.C., Drevon A.M. Inhibition of PCR by aqueous and vitreous fluids // *J. Clin. Microbiol.* 1995. V. 33. P. 2643-2646.
138. Wilson I.G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification // *Appl. Environ. Microbiol.* 1997. V. 63. P. 3741-3751.
139. Yedidag E.N., Koffron A.J., Mueller K.H., Kaplan B., Kaufman D.B., Fryer J.P., Stuart F.P., Abecassis M. Acyclovir triphosphate inhibits the diagnostic polymerase chain reaction for cytomegalovirus // *Transplantation.* 1996. V. 62. P. 238-242.
140. Yoon C-S., Glawe D.A. Pretreatment with Rnase to improve PCR amplification of DNA using 10-mer primers // *Biotechniques.* 1993. V. 14. P. 908-910.
141. Zhang Z., Kermekchiev M.B., Barnes W.M. Direct DNA amplification from crude clinical samples using a PCR enhancer cocktail and novel mutants of Taq // *J. Mol. Diagn.* 2010. V. 12. P. 152-161.
142. Zhu H., Qu F., Zhu L.H. Isolation of genomic DNAs from plants, fungi and bacteria using benzyl chloride // *Nucleic Acids Res.* 1993. V. 21. P. 5279-5280.

#### CAUSES OF FALSE-NEGATIVE PCR AND HOW TO AVOID SOME OF THEM

Chemeris A.V., Chemeris D.A., Magdanov E.G., Garafutdinov R.R., Nagaev N.R., Vakhitov V.A.

Institute of Biochemistry and Genetics of Ufa Science Centre of Russian Academy of Sciences, Ufa, [chemeris@anrb.ru](mailto:chemeris@anrb.ru)

The analysis of the available methodological literature devoted to false-negative results in PCR is carried out. It focuses on the inhibition of PCR with substances of different nature, as well as improvement of the amplification process using certain additives and with the help of various DNA polymerases, including genetically engineered modified variants of them.

**Keywords:** PCR, reverse transcriptase PCR, RT-PCR, false-negative PCR, amplicon, DNA polymerase, reverse transcriptase, DNA, RNA, nucleic acids, extraction, inhibitors, facilitators