



ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА ФОРМИРОВАНИЕ МУЛЬТИМЕРНЫХ ПРОДУКТОВ ЦЕПЬ-ВЫТЕСНЯЮЩИМИ ДНК ПОЛИМЕРАЗАМИ В УСЛОВИЯХ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ

Гильванов А.Р., Сахабутдинова А.Р., Гарафутдинов Р.Р.

Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение
Федерального государственного бюджетного научного учреждения
Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук
450054, пр. Октября, 71, г. Уфа, Россия, e-mail: aidar_gilvanov@mail.ru

Резюме

Амплификация нуклеиновых кислот является одним из ключевых методов в молекулярно-биологических исследованиях и клинической диагностике. Отличная альтернатива широко распространенной полимеразой цепной реакции - изотермические методы, например, амплификация «катящимся кольцом». Для выполнения амплификации в изотермических условиях применяют ДНК полимеразы с цепь-вытесняющей активностью. В данной работе изучено влияние температуры на образование специфических и неспецифических продуктов в амплификации «катящимся кольцом» ДНК полимеразы 9°Nm, Vent exo⁻, Hemo KlenTaq. Определены значения температуры, при которых наиболее эффективно происходит образование неспецифических мультимерных продуктов на линейной матрице и целевых конкатемерных продуктов на кольцевой матрице. Полученные результаты позволяют разработать более специфичные методы изотермической амплификации с указанными ДНК полимеразы.

Ключевые слова: изотермическая амплификация; мультимеризация; ДНК полимеразы; цепь-вытесняющая активность.

Цитирование: Гильванов А.Р., Сахабутдинова А.Р., Гарафутдинов Р.Р. Влияние температуры на формирование мультимерных продуктов цепь-вытесняющими ДНК полимеразы в условиях изотермической амплификации // Биомика. 2020. Т.12(4). С. 469-474. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-40

© Авторы

THE INFLUENCE OF TEMPERATURE ON THE MULTIMERIC PRODUCTS FORMATION BY STRAND-DISPLACEMENT DNA POLYMERASES IN THE CONDITIONS OF ISOTHERMAL AMPLIFICATION

Gilvanov A.R., Sakhabutdinova A.R., Garafutdinov R.R.

Institute of Biochemistry and Genetics - Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, prosp. Oktyabrya, 71, Ufa, 450054, Russia, e-mail: aidar_gilvanov@mail.ru

Resume

The nucleic acids amplification is one of the key methods for molecular biology research and clinical diagnostics. The isothermal amplification methods, for example rolling circle amplification, are a good alternative for a widely spread polymerase chain reaction. Strand-displacement DNA polymerases are required for isothermal amplification. In this work, we studied the influence of temperature on the formation of specific and non-specific amplification products by 9°Nm, Vent exo⁻, Hemo KlenTaq DNA polymerases during rolling circle amplification. The temperature values for the most effective formation of non-specific products and specific concatemeric products were determined. The obtained data will allow the development of more specific isothermal amplification methods with DNA polymerases used.

Key words: isothermal DNA amplification; multimerization; DNA polymerases; strand-displacing activity.

Citation: Gilvanov A.R., Sakhabutdinova A.R., Garafutdinov R.R. The influence of temperature on the multimeric products formation by strand-displacement DNA polymerases in the conditions of isothermal amplification. *Biomics*. V.12(4). P. 469-474. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-40 (In Russian)

© The Authors

Одним из важнейших инструментов в современной клинической диагностике и научных исследованиях является амплификация нуклеиновых кислот. С момента первой публикации по методу полимеразной цепной реакции [Saiki et al., 1985] было разработано большое количество разнообразных подходов к амплификации [Notomi et al., 2000; Walker et al., 1992]. Наиболее перспективными и привлекательными с точки зрения практического применения являются изотермические методы амплификации, обладающие не только высокой чувствительностью и специфичностью, но и не требующие специального оборудования для термоциклирования [Qi et al., 2018; Salamin et al., 2017].

Изотермическая амплификация осуществляется с помощью полимераз с цепь-вытесняющей активностью. Для решения практических задач наиболее часто используют следующие ферменты с данным свойством: фрагмент Кленова, ϕ 29, Vent exo^- , Bst exo^- . Характерной особенностью последней является формирование неспецифических мультимерных продуктов - в присутствии линейной матрицы и пары праймеров к ней, амплификация приводит к образованию продуктов, состоящих из tandemно расположенных повторов нуклеотидной последовательности матрицы [Hafner et al., 2001]. Дифференциация неспецифических мультимерных продуктов и специфических конкатемерных продуктов (сформированных, например, в процессе амплификации по типу «катящегося кольца», АКК) невозможна ни при отслеживании процесса в реальном времени, ни при регистрации результатов по конечной точке, а это может приводить к получению ложноположительных результатов.

Температура является одним из ключевых факторов успешной амплификации нуклеиновых кислот, так как от нее зависит эффективность отжига праймеров и их элонгации. Кроме того, установление температуры близкой к температуре плавления ДНК-дуплекса приводит к так называемому «дыханию цепи» - спонтанным конформационным флуктуациям, влекущим частичное раскрытие двойной спирали [von Hippel et al., 2013]. Симуляционные эксперименты показали, что «дыхание цепи» приводит к увеличению гибкости коротких ДНК-дуплексов, а это, вероятно, вносит вклад в эффективность неспецифической амплификации [Lee et al., 2010]. На данный момент в литературе отсутствуют детальные данные о влиянии температуры на формирование неспецифических продуктов в процессе изотермической амплификации.

В связи с этим, нами было изучено воздействие температурных условий на протекание амплификации по типу «катящегося кольца» и побочного процесса мультимеризации для трех ДНК полимераз, обладающих цепь-вытесняющей активностью.

Материалами для исследования служили: ДНК полимеразы 9^oNm, Vent exo^- , Hemo KlenTaq и поставляемые с ними буферы (New England Biolabs, США); матрица ML (CCTCTTGCTTTTCGCTCTCGTTCTTTACAGAACACA GACGAGAAGAAGACCA, 51 нт) и соответствующая ей пара праймеров (праймер F – CCTCTTGCTTTTCGCTCTCGTTCTTT, 25 нт; праймер R – TGGTCTTCTTCTCGTCTGTGTCTGT, 26 нт).

Кольцевую матрицу MC получали путем циклизации ML в присутствии ДНК лигазы T4 и поддерживающей матрицы [Сахабутдинова и др. (Sakhabutdinova et al.), 2017]. Амплификацию проводили в реальном времени и с регистрацией результатов по конечной точке методом гель-электрофореза в 10% полиакриламидном геле. Протокол амплификации состоял из следующих этапов: 1) условная «денатурация» при 70^oC - 30 с; 2) условный «отжиг» при 65^oC - 60 с; 3) элонгация в градиенте температур 50-80^oC - 3 ч (для амплификации в реальном времени) или 2 ч (для амплификации с детекцией результатов по конечной точке). Схема эксперимента была представлена нами в предыдущих публикациях [Garafutdinov et al., 2020; Гильванов и др. (Gilvanov et al.), 2018].

При амплификации линейной матрицы ML, праймер R отжигается на 3'-конце матрицы и выступает в качестве затравки. Праймер F отжигается на продукте удлинения праймера R. В результате образуются продукты с длиной, кратной длине исходной матрицы - мультимеры. При амплификации кольцевой матрицы MC, праймер R также выступает в качестве затравочного и отжигается на матрице. Удлинение праймера приводит к образованию длинного одноцепочечного продукта, состоящего из многократно повторяющейся последовательности, комплементарной кольцевой матрице, и множества сайтов отжига для праймера F. Результатом реакции являются конкатемерные продукты, имеющие длины, кратные длине исходной матрицы.

Дифференциация обоих типов продуктов невозможна ни при отслеживании течения процесса в реальном времени, ни с регистрацией результатов по конечной точке. Очевидно, что условия протекания амплификации и компоненты реакционной смеси

оказывают прямое влияние на кинетику реакции и формирование продуктов. Учитывая случайность инициации процесса мультимеризации и его эффективность в определенных условиях, актуальным является поиск таких параметров реакции, при

которых наработка неспецифических продуктов, т.е. мультимеров, полностью подавляется, а эффективность процесса АКК остается неизменно высокой.

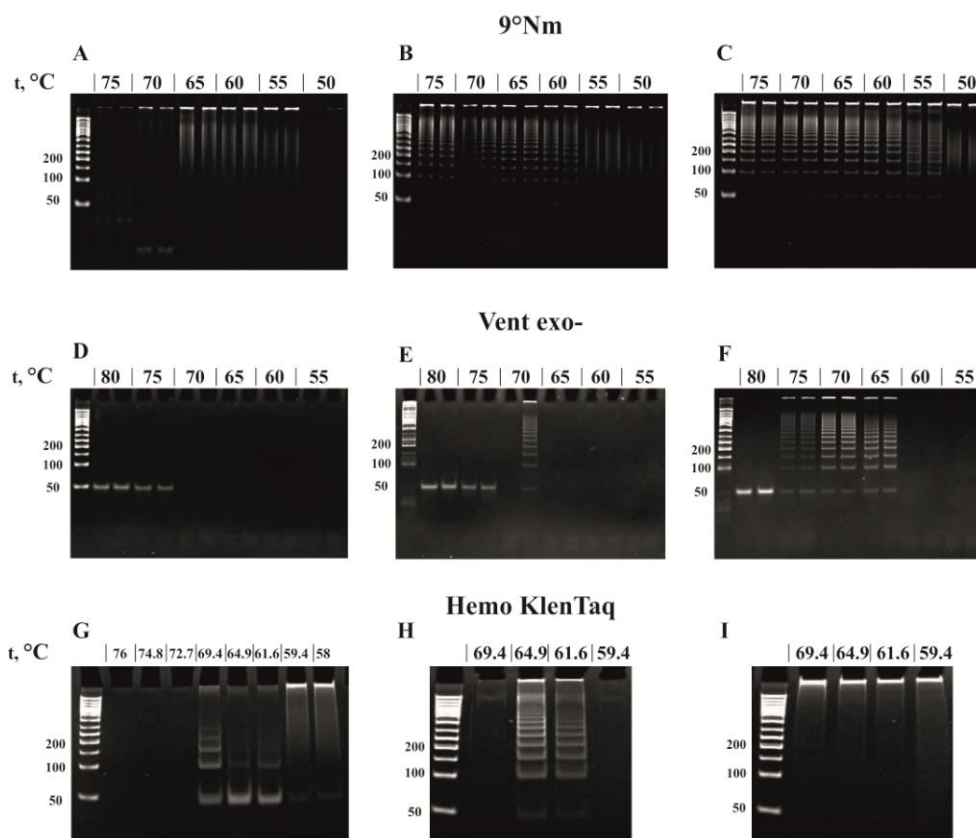


Рисунок 1. - Электрофорез продуктов амплификации / Figure 1. - Electrophoresis of amplification products
 A, D - продукты амплификации полимеразми 9°Nm и Vent exo⁻ соответственно в отсутствие матрицы; amplification products obtained with 9°Nm and Vent exo⁻ polymerases respectively in the absence of template;
 B, E - продукты амплификации линейной матрицы полимеразми 9°Nm и Vent exo⁻ соответственно; amplification products obtained on linear template with 9°Nm and Vent exo⁻ polymerases respectively;
 C, F - продукты амплификации кольцевой матрицы полимеразми 9°Nm и Vent exo⁻ соответственно; amplification products obtained on circular template with 9°Nm and Vent exo⁻ polymerases respectively;
 G - продукты амплификации линейной матрицы полимеразой Hemo KlenTaq; amplification products obtained on linear template with Hemo KlenTaq polymerase;
 H - продукты амплификации кольцевой матрицы полимеразой Hemo KlenTaq в изотермическом режиме; amplification products obtained on circular template with Hemo KlenTaq polymerase during isothermal protocol;
 I - продукты амплификации кольцевой матрицы полимеразой Hemo KlenTaq в режиме циклирования; amplification products obtained on circular template with Hemo KlenTaq polymerase during cycling protocol.

Ранее нами детально были изучены условия изотермической амплификации, способствующие наиболее эффективной наработке мультимерных продуктов ДНК полимеразми Bst exo⁻ [Garafutdinov et al., 2020]. Установлено, что Bst exo⁻ преимущественно образуют мультимеры в температурном диапазоне 55-60°C, тогда как для формирования конкатемерных продуктов амплификации кольцевой матрицы

оптимальным является диапазон 60-63°C, близкий к температурному оптимуму фермента (65°C). На сегодняшний день для решения различных задач доступно большое количество ДНК полимераз с цепь-вытесняющей активностью. Некоторые из них также обладают способностью к наработке неспецифических продуктов или *ab initio* синтезу олигонуклеотидов в определенных условиях [Emery et al., 2018; Liang et al.,

2007]. Нами были отобраны три термостабильные ДНК полимеразы (9°Nm, Vent exo⁻ и Немо KlenTaq) с каждой из которых проводилась амплификация в градиенте температур в трех вариантах: без матрицы, в присутствии линейной матрицы, в присутствии кольцевой матрицы. Диапазон температур для полимераз 9°Nm, Vent exo⁻ составил 50-80°С, а для Немо KlenTaq – 58-76°С.

Полимераза 9°Nm показала крайне высокую способность к наработке неспецифических продуктов. Так, в отсутствии матрицы и при наличии только затравочного праймера R в реакционной смеси, наблюдается наработка недифференцируемых продуктов амплификации, проявляющихся в геле в виде шмера, в диапазоне 55-80°С (рис. 1 А). В случаях с кольцевой и линейной матрицами, наработка продуктов наблюдается во всем исследуемом диапазоне, с наибольшей эффективностью при 65-75°С. Обнаружено, что

минимальная длина конкатемерных и мультимерных продуктов амплификации, сформированных при значении температуры 75°С, составляет 100 пн, что соответствует двум длинам исходной матрицы (рис. 1 В, С).

В случае полимеразы Vent exo⁻, при отсутствии матрицы, формирования продуктов в диапазоне 50-70°С не происходит. Однако при значениях 75-80°С наблюдается наработка коротких ампликонов длиной около 50 п.н. Идентичные продукты были сформированы при тех же значениях в присутствии матриц и, по-видимому, являются удлиненными праймерами (рис. 1 D-F). Единственным значением температуры, при котором наблюдается наработка мультимерных продуктов является 70 °С, тогда как наработка конкатемерных продуктов на кольцевой матрице возможна в диапазоне 65-75°С с оптимумом при 70°С.

Таблица 1.

Зависимость порогового времени Tt (мин) от температурных условий амплификации
Table 1. Function of time-to-threshold (min) and amplification temperature conditions

Полимераза; оптимум температуры Polymerase; temperature optimum	Тип матрицы Template type	Температура, °С Temperature, °C						
		50	55	60	65	70	75	80
9°Nm 75°С	Без матрицы ¹ No template ¹	-	120,8±3,5	60,0±4,7	37,5±1,1	25,0±0,0	6,7±0,0	-
	Линейная Linear	58,3±0,0	53,3±0,0	55,0±2,4	26,7±0,0	28,3±0,0	1,0±0,0	110,0±0,0
	Кольцевая Circular	50,0±0,0	45,0±0,0	25,0±0,0	13,3±0,0	11,7±0,0	1,8±0,0	113,3±0,0
Vent exo ⁻ 75°С	Без матрицы No template	-	-	-	-	-	133,3±0,0*	110,9±8,3*
	Линейная Linear	-	-	-	-	155,0±0,0	133,3±0,0*	118,3±0,0*
	Кольцевая Circular	-	-	-	120,0±0,0	66,7±0,0	118,3±0,0	115,0±0,0*
Немо KlenTaq ² 68 °С	Температура, °С Temperature, °C	58,0	59,4	61,6	64,9	69,4	72,7	74,8
	Без матрицы No template	-	-	-	-	-	-	-
	Линейная Linear	9,9±0,0	10,1±0,3	7,1±3,5	7,7±0,2	7,7±1,5	-	-
	Кольцевая Circular	-	165,0±2,4	133,3±0,0	116,7±0,0	166,7±0,0	-	-

¹ - амплификация проводилась в присутствии только затравочного праймера R; the amplification was carried out in the presence of only primer R;

² - для линейной матрицы приведены значения Ct, полученные в режиме циклирования; the Ct values obtained during cycling amplification are given for the linear template;

* - формирование продуктов удлинения праймеров, отсутствие конкатемеров или мультимеров; formation of primer elongation products, concatemer or multimer products are absent.

Полимераза Немо KlenTaq, согласно заверениям производителя, не обладает цепь-вытесняющей активностью (<https://www.neb.com/tools-and-resources/selection-charts/dna-polymerase-selection-chart>). Однако мы обнаружили, что в диапазоне 59,4-69,4°C происходит наработка продуктов на кольцевой матрице. Электрофорез в полиакриламидном геле показал, что в данном случае образуются конкатемерные продукты: в образцах, полученных при 61,6 и 65°C, наблюдаются четкие полосы с длинами кратными длине исходной матрице, а в образцах, полученных при 59,4 и 69,4 °C дифференциация продуктов невозможна (рис. 1 Н). Данный факт свидетельствует о наличии у Немо KlenTaq цепь-вытесняющей активности. Нам не удалось получить мультимерные продукты в изотермическом режиме, поэтому реакция была продолжена в режиме циклирования, состоящего из этапов денатурации и элонгации (1 – 95,0°C – 3 мин – первичная денатурация; 40 циклов: 2 – 95,0°C – 20 сек – денатурация; 3 – 58,0-76,0°C – элонгация). В температурном диапазоне 72,7-76,0°C амплификация не проходит, тогда как в диапазоне 58,0-69,4°C наблюдается наработка неспецифических продуктов (рис. 1 Г). Образование мультимеров происходит в более узком диапазоне – 61,6-69,4°C, с оптимумом 69,4°C. Амплификация на кольцевой матрице в режиме циклирования, при тех же температурах элонгации, что и в изотермическом режиме, привела к формированию недифференцируемых продуктов (рис. 1 I). Наработка мультимерных продуктов в режиме циклирования и их отсутствие при изотермических условиях амплификации, вероятно, связаны со слабой цепь-вытесняющей активностью и низкой скоростью работы полимеразы (около 0,5 кб/мин при 68°C).

Таким образом, для полимераз Vent exo⁻ и Немо KlenTaq, оптимальными значениями температуры, способствующими наиболее эффективной наработке конкатемерных продуктов являются соответственно 65-75°C и 59,4-69,4°C. Учитывая, что данные полимеразы способны к амплификации на линейной матрице при строго определенных значениях температуры (70°C – для Vent exo⁻, и 69,4°C в режиме термоциклирования для Немо KlenTaq), варьирование данного параметра позволяет подобрать такие условия амплификации, при которых наработка мультимерных продуктов полностью подавляется. К сожалению, формирование неспецифических продуктов полимеразой 9°Nm осуществляется независимо от температуры, поэтому, в данном случае, необходим поиск иных путей подавления мультимеризации. Полученные результаты позволят разработать новые, более специфичные методы изотермической амплификации нуклеиновых кислот указанными полимеразми.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-34-90010/19.

Литература

1. Гильванов А.Р., Сахабутдинова А.Р., Чемерис А.В., Гарафутдинов Р.Р. Влияние SYBR Green I на протекание изотермической амплификации с помощью ДНК полимеразы Bst exo⁻ // *Биомика*. 2018. Т. 10(3). С. 268-273. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-35.
2. Сахабутдинова А.Р., Максимова М.А., Гарафутдинов Р.Р. Получение кольцевых одноцепочечных ДНК-матриц с помощью T4 РНК лигазы для амплификации по типу катящегося кольца // *Молекулярная биология*. 2017. Т. 51(4). С. 724-733. doi: 10.7868/S0026898417040164.
3. Emery N.J., Majumder S., Liu A.P. Synergistic and non-specific nucleic acid production by T7 RNA polymerase and Bsu DNA polymerase catalyzed by single-stranded polynucleotides // *Synth. Syst. Biotechnol.* 2018. V. 3. P. 130-134. doi: 10.1016/j.synbio.2018.02.005.
4. Garafutdinov R.R., Gilvanov A.R., Sakhabutdinova, A.R. The Influence of Reaction Conditions on DNA Multimerization During Isothermal Amplification with Bst exo⁻ DNA Polymerase // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2020. V. 190. P. 758-771. doi: 10.1007/s12010-019-03127-6.
5. Hafner G.J., Yang I.C., Wolter L.C., Stafford M.R., Giffard P.M. Isothermal amplification and multimerization of DNA by Bst DNA polymerase // *BioTechniques*. 2001. V. 30. P. 852-856. doi: 10.2144/01304rr03.
6. Lee O., Jeon J.-H., Sung, W. How double-stranded DNA breathing enhances its flexibility and instability on short length scales // *Phys. Rev.* 2010. V. 81. 021906. doi: 10.1103/PhysRevE.81.021906.
7. Liang X., Kato T., Asanuma H. Unexpected efficient ab initio DNA synthesis at low temperature by using thermophilic DNA polymerase // *Nucleic Acids Symp. Se. (Oxf)*. 2007. V. 51. P. 351-352. doi: 10.1093/nass/nrm176.
8. Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA // *Nucleic Acids Research*. 2000. V. 28. e63. doi: 10.1093/nar/28.12.e63.
9. Qi H., Yue S., Bi S., Ding C., Song W. Isothermal exponential amplification techniques: from basic principles to applications in electrochemical

- biosensors // *Biosens. Bioelectron.* 2018. V. 110. P. 207-217. doi: 10.1016/j.bios.2018.03.065.
10. Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., Arnheim, N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia // *Science*. 1985. V. 230. P. 1350-1354. doi: 10.1126/science.2999980.
 11. Salamin O., Kuuranne T., Saugy M., Leuenberger N. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) as an alternative to PCR: A rapid on-site detection of gene doping // *Drug. Test. Anal.* 2017. V. 9. P. 1731-1737. doi: 10.1002/dta.2324.
 12. von Hippel P.H., Johnson N.P., Marcus, A.H. 50 years of DNA 'Breathing': Reflections on Old and New Approaches // *Biopolymers*. 2013. V. 99. P. 923-954. doi: 10.1002/bip.22347.
 13. Walker G.T., Fraiser M.S., Schram J.L., Little M.C., Nadeau J.G., Malinowski D.P. Strand displacement amplification – an isothermal, in vitro DNA amplification technique // *Nucleic Acids Research*. 1992. V. 20. P. 1697-1696. doi: 10.1093/nar/20.7.1691.
 14. Zeida A., Machado M.R., Dans P.D., Pantano S. Breathing, bubbling, and bending: DNA flexibility from multimicrosecond simulations // *Phys. Rev.* 2012. V. 86. 021903. doi: 10.1103/PhysRevE.86.021903.
 5. Lee O., Jeon J.-H., Sung W. How double-stranded DNA breathing enhances its flexibility and instability on short length scales. *Phys. Rev.* 2010. V. 81. 021906 doi: 10.1103/PhysRevE.81.021906.
 6. Liang X., Kato T., Asanuma H. Unexpected efficient ab initio DNA synthesis at low temperature by using thermophilic DNA polymerase. *Nucleic Acids Symp. Se. (Oxf)*. 2007. V. 51. P. 351-352. doi: 10.1093/nass/nrm176.
 7. Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*. 2000. V. 28. e63. doi: 10.1093/nar/28.12.e63.
 8. Qi H., Yue S., Bi S., Ding C., Song W. Isothermal exponential amplification techniques: from basic principles to applications in electrochemical biosensors. *Biosens. Bioelectron.* 2018. V. 110. P. 207-217. doi: 10.1016/j.bios.2018.03.065.
 9. Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., Arnheim, N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 1985. V. 230. P. 1350-1354. doi: 10.1126/science.2999980.
 10. Sakhabutdinova A.R., Maksimova M.A., Garafutdinov R.R. Synthesis of Circular DNA Templates with T4 RNA Ligase for Rolling Circle Amplification. *Molecular Biology (Mosk)*. 2017. V. 51(4). P. 724-733. doi: 10.7868/S0026898417040164.
 11. Salamin O., Kuuranne T., Saugy M., Leuenberger N. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) as an alternative to PCR: A rapid on-site detection of gene doping. *Drug. Test. Anal.* 2017. V. 9. P. 1731-1737. doi: 10.1002/dta.2324.
 12. von Hippel P.H., Johnson N.P., Marcus A.H. 50 years of DNA 'Breathing': Reflections on Old and New Approaches. *Biopolymers*. 2013. V. 99. P. 923-954. doi: 10.1002/bip.22347.
 13. Walker G.T., Fraiser M.S., Schram J.L., Little M.C., Nadeau J.G., Malinowski D.P. Strand displacement amplification – an isothermal, in vitro DNA amplification technique. *Nucleic Acids Research*. 1992. V. 20. P. 1697-1696. doi: 10.1093/nar/20.7.1691.
 14. Zeida A., Machado M.R., Dans P.D., Pantano S. Breathing, bubbling, and bending: DNA flexibility from multimicrosecond simulations. *Phys. Rev.* 2012. V. 86. 021903. doi: 10.1103/PhysRevE.86.021903.
- References**
1. Emery N.J., Majumder S., Liu A.P. Synergistic and non-specific nucleic acid production by T7 RNA polymerase and Bsu DNA polymerase catalyzed by single-stranded polynucleotides. *Synth. Syst. Biotechnol.* 2018. V. 3. P. 130-134. doi: 10.1016/j.synbio.2018.02.005.
 2. Garafutdinov R.R., Gilvanov A.R., Sakhabutdinova A.R. The Influence of Reaction Conditions on DNA Multimerization During Isothermal Amplification with Bst exo- DNA Polymerase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2020. V. 190. P. 758-771. doi: 10.1007/s12010-019-03127-6.
 3. Gilvanov A.R., Sakhabutdinova A.R., Chemeris A.V., Garafutdinov R.R. The influence of SYBR Green I on isothermal amplification with Bst exo-DNA polymerase. *Biomics*. 2018. V.10(3). P. 268-273. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-35.
 4. Hafner G.J., Yang I.C., Wolter L.C., Stafford M.R., Giffard P.M. Isothermal amplification and multimerization of DNA by Bst DNA polymerase. *BioTechniques*. 2001. V. 30. P. 852-856. doi: 10.2144/01304rr03.