



ВЛИЯНИЕ НУКЛЕОТИДНОГО СОСТАВА ДНК-МАТРИЦ НА ПРОТЕКАНИЕ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО (*AB INITIO*) СИНТЕЗА ДНК

Ханова Л.И., Гарафутдинов Р.Р., Сахабутдинова А.Р., Чемерис А.В.

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

Резюме

Обнаружение специфичных нуклеотидных последовательностей является основой современных методов ДНК- и РНК-анализа, которое осуществляют, как правило, путем наработки фрагментов нуклеиновых кислот (НК) с помощью реакций амплификации с последующей детекцией результатов различными способами. Несмотря на огромное количество вариантов амплификации НК, одной из серьезных проблем является обеспечение высокой достоверности, напрямую связанной со специфичностью реакции синтеза ДНК. Ранее для разных ДНК-полимераз было показано протекание неспецифической амплификации даже в отсутствие матриц и праймеров. В данной работе показана склонность цепь-вытесняющих ДНК-полимераз весьма активно вести синтез ДНК *ab initio*. Наиболее ярко это свойство проявляется у термостабильных полимераз, что обусловлено, вероятно, высокой эффективностью образования в ходе термоциклирования пригодных для элонгации гетеродуплексов. С наибольшей скоростью синтез ДНК *ab initio* протекает при наличии в системе двуцепочечных ДНК, олиго-dT₁₈ или матриц, состоящих из нуклеотидных повторов.

Ключевые слова: нуклеиновые кислоты, амплификация нуклеиновых кислот, синтез ДНК *ab initio*, цепь-вытесняющие ДНК-полимеразы, специфичность

Цитирование: Ханова Л.И., Гарафутдинов Р.Р., Сахабутдинова А.Р., Чемерис А.В. Влияние нуклеотидного состава ДНК-матриц на протекание неспецифического (*ab initio*) синтеза ДНК // *Biomics*. 2022. Т.14(4). С. 359-367. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2022-38

© Авторы

THE INFLUENCE OF DNA TEMPLATES COMPOSITION ON NON-SPECIFIC (*AB INITIO*) DNA SYNTHESIS

Khanova L.I., Garafutdinov R.R., Sakhabutdinova A.R., Chemeris A.V.

Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, prospect Oktyabrya, 71, Ufa, 450054, Russia, e-mail: garafutdinovr@mail.ru

Summary

Detection of specific nucleic acids (NA) is the basis of modern methods for DNA and RNA analysis, which is carried out during amplification reactions followed by detection of amplification results. Despite the huge number of NA amplification techniques has been developed, the demand for high reliability is still relevant. This article is related to the specificity of the DNA synthesis reaction. Previously,

nonspecific amplification was shown for various DNA polymerases even in the absence of templates and primers. In this study, the propensity of strand-displacement DNA polymerases to provide efficient *ab initio* DNA synthesis is shown. This property is most intrinsic for thermostable polymerases, which is probably due to the higher efficiency of formation of DNA heteroduplexes suitable for elongation during thermal cycling. *Ab initio* DNA synthesis proceeds at the highest rate in the presence of double-stranded DNA, oligo-dT₁₈, or templates consisting of nucleotide repeats.

Keywords: nucleic acids, nucleic acids amplification, *ab initio* DNA synthesis, strand-displacement DNA polymerases, specificity

Citation: Khanova L.I., Garafutdinov R.R., Sakhabutdinova A.R., Chemeris A.V. The influence of DNA templates composition on nonspecific (*ab initio*) DNA synthesis // *Biomcs.* 2022. V.14(1). P. 359-367. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2022-38

© **Authors**

Введение

Ограничение использования ряда методов амплификации НК для молекулярной диагностики обусловлено недостаточной достоверностью получаемых результатов. Особенно ярко это проявилось в 2020 году, когда при впечатляющем многообразии тест-систем для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 наблюдалась проблема так называемых «пропущенных» и бессимптомных пациентов с COVID-19, обусловленная, в том числе получением ложноотрицательных и ложноположительных результатов. В ряде статей, опубликованных по итогам исследований во время эпидемии SARS-CoV-2 в Китае в первые месяцы 2020 г., сообщалось о шокирующе низкой эффективности ПЦР-тестов на этот коронавирус. Казалось бы, неудовлетворительная достоверность молекулярной диагностики может быть обусловлена несколькими причинами: 1) условиями получения генетического материала (качество взятия биологического материала, его транспортировка до лаборатории, пробоподготовка), 2) стабильностью генетического материала (особенно актуально в случае РНК), 3) качеством реагентов в диагностическом наборе, 4) квалификацией работников и специалистов, задействованных на каждом этапе работы. Однако, помимо вышеперечисленного, могут оказывать существенное влияние и неочевидные причины, обусловленные неизвестными, неизученными пока свойствами компонентов диагностических тест-систем.

Главными составляющими амплификационных систем, определяющими их специфичность и чувствительность, являются полимеразы и их субстрат - нуклеиновые кислоты (НК). От их состояния (для НК) и особенностей структуры и свойств (для полимераз) зависит успешность амплификации. К сожалению, полимеразы не

являются абсолютно точным молекулярным инструментом, что приводит к ошибкам при репликации и транскрипции как *in vivo*, так и в реакциях амплификации *in vitro*. Даже улучшенные и созданные генно-инженерным путем полимеразы не лишены ряда недостатков. Ранее неоднократно была показана способность многих термостабильных ДНК полимераз осуществлять синтез ДНК *ab initio*. Он описан для разных полимераз и может протекать в отсутствие матриц и даже праймеров при наличии только трифосфатов. Было показано, что при этом образуются фрагменты ДНК разной длины, содержащие преимущественно нуклеотиды А или Т [Ogata, Miura, 1997, 1998a, 1998b]. Ускорение синтеза ДНК *ab initio* происходило при добавлении в реакционную смесь никаз [Antipova et al., 2014]. Для ДНК полимераз с цепь-вытесняющей активностью протекает реакция неспецифической амплификации, заключающаяся в мультимеризации НК [Garafutdinov et al., 2020a], что является, похоже, одной из главных проблем методов изотермической амплификации [Зырина, Антипова, 2021].

По-видимому, причина неспецифической активности многих полимераз кроется в наличии неизвестных на сегодня свойств этой группы ферментов или особенностей взаимодействия их с субстратом. Так, в последние годы появляются данные о контекстно-зависимых свойствах ДНК, когда для нуклеотидных последовательностей определенного состава наблюдаются аномалии в протекании тех или иных процессов, в том числе амплификации. В 2000 г. *in silico* были определены конформационные параметры молекул ДНК в тетра-нуклеотидном приближении [Packer et al., 2000], что позволило сформировать представление о так называемых контекстно-зависимых динамических свойствах ДНК и в дальнейшем получить первые экспериментальные доказательства сайт-

специфического действия ультразвука на ДНК [Гарафутдинов и др. (Garafutdinov et al.), 2016; Garafutdinov et al., 2019]. Имеются данные о том, что неспецифичная амплификация ДНК под действием полимеразы *Bst* *exo*⁻ является контекстно-зависимой [Qian et al., 2012].

Для предотвращения неспецифической амплификации НК и повышения достоверности результатов было предложено множество подходов [Чемерис и др. (Chemeris et al.), 2011; 2012a; 2012b; Бикбулатова и др. (Bikbulatova et al.), 2012], в том числе применительно к изотермической амплификации [Rolando et al., 2020; Garafutdinov et al., 2020b; 2020c; Sakhabutdinova et al., 2021; Сахабутдинова и др. (Sakhabutdinova et al.), 2020]. Однако определение молекулярного механизма неспецифического синтеза ДНК по механизму *ab initio* остается актуальной задачей. Целью данной работы стала оценка влияния первичной структуры ДНК-матриц на характер синтеза ДНК *ab initio*.

Материалы и методы

Использованные реактивы: ДНК полимеразы Vent *exo*⁻, 9°Nm, Hemo KlenTaq, *Bst* LF, *Bsu* (New England Biolabs), *Bsm*, *phi*29 (ThermoFisher Scientific), фрагмент Кленова (СибЭнзим); акриламид, N,N'-метиленабисакриламид, Трис, динатриевая соль N,N,N',N'-этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), персульфат аммония, N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (AppliChem); дезоксинуклеозидтрифосфаты (dNTPs) (СибЭнзим), SYBR Green I (Lumiprobe), маркеры длин ДНК (New England Biolabs). Для приготовления всех растворов использовали воду высшей категории качества (>18 МОм). Олигонуклеотидные матрицы и праймеры получены из ООО Синтол (Россия).

Амплификация НК. Все образцы для амплификации готовили в ПЦР-боксе с рециркулятором UVC/T-M-AR (Biosan), предварительно облучая рабочее пространство, автоматические дозаторы и пластиковую посуду ультрафиолетом в течение 20 мин. Каждый образец был представлен в трех повторах.

Амплификацию с детекцией результатов по конечной точке проводили в ДНК-амплификаторе iQ5 (Bio-Rad Laboratories). Реакционные смеси имели объем 20 мкл и содержали 10 пмоль соответствующей НК-матрицы (табл. 1), 2 ед. акт. соответствующей ДНК-полимеразы, 2.0 мкл смеси дНТФ с концентрацией 2.5 мМ, 2 мкл буфера ДНК-полимеразы и 1× интеркалирующий краситель SYBR Green I. Реакцию вели в изотермическом (при 60°С), квази-изотермическом (щадящее термоциклирование в режиме 30-68°С по 20 сек на температурный шаг)

режимах и при термоциклировании (режим 95-30-72°С продолжительностью 10-20-20 сек на температурный шаг).

Анализ результатов амплификации осуществляли методом гель-электрофореза в 10%-ном полиакриламидном геле в камере вертикального типа VE-10 (Хеликон) при напряжении 90-110 В с последующим окрашиванием бромистым этидием и визуализацией в приборе Gel Camera System (UVP Inc.).

Результаты и обсуждение

Для проведения экспериментов были взяты следующие цепь-вытесняющие ДНК-полимеразы (цв-ДНК-пол): Vent *exo*⁻, 9°Nm, Hemo KlenTaq, *Bst* *exo*⁻ (форма *Bst* LF), *Bsm*, *Bsu*, *phi*29, фрагмент Кленова. ДНК-полимераза Hemo KlenTaq позиционируется производителем как фермент для проведения классической ПЦР, но не обладает 5'→3'-экзонуклеазной активностью. Мы предположили, что данная полимераза обладает цепь-вытесняющей активностью. Действительно, оказалось, что Hemo KlenTaq способна вести амплификацию катящимся кольцом (АКК), хотя и с меньшей эффективностью, чем *Bst* *exo*⁻, что свидетельствует о ее заметной цепь-вытесняющей активности (неопубликованные данные).

Способность цв-ДНК-пол вести синтез ДНК *ab initio* изучали на модельных НК: олигонуклеотидах длиной 18 звеньев, приведенных в таблице 1. Набор матриц включал как гомоолигонуклеотиды, так и олигонуклеотиды, состоящие исключительно из пуриновых или пиримидиновых нуклеотидов, а также только из АТ или GC. В качестве контроля были взяты полностью вырожденный олигонуклеотид dN₁₈ и олигонуклеотид Rand со случайной последовательностью. К последнему был подобран полностью комплементарный ему Rand-comp1, образующий с Rand совершенный дуплекс.

Указанные в таблице 1 олигонуклеотиды были взяты для проведения реакций амплификации в количестве, которое обычно применяется для праймеров (5 пмоль). На один амплификационный образец брался только один олигонуклеотид (за исключением образцов, содержащих дуплекс, образованный Rand и Rand-comp1). Таким образом, взятые олигонуклеотиды выступали одновременно и матрицами, и праймерами. Амплификацию вели в изотермическом режиме (при 60°С для всех тестируемых полимераз), при термоциклировании (режим 95-30-72°С только для термостабильных полимераз) и в условиях "щадящего" термоциклирования (30-68°С для *Bst* LF и *Bsm*).

Таблица 1.

Олигонуклеотиды, использованные для оценки способности цв-ДНК-пол вести синтез ДНК *ab initio*.
Table 1. Oligonucleotides used to evaluate the ability of sd-DNA-pol to carry out *ab initio* DNA synthesis.

№ No.	Название Name	Последовательность, 5'→3' Sequence, 5'→3'	Длина, нт Size, nt
1	dA ₁₈	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	18
2	dC ₁₈	CCCCCCCCCCCCCCCCCC	18
3	dG ₁₈	GGGGGGGGGGGGGGGGGG	18
4	dT ₁₈	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	18
5	d(AG) ₉	AGAGAGAGAGAGAGAGAG	18
6	d(CT) ₉	CTCTCTCTCTCTCTCTCT	18
7	d(CG) ₉	CGCGCGCGCGCGCGCGCG	18
8	d(AT) ₉	ATATATATATATATATAT	18
9	dN ₁₈	NNNNNNNNNNNNNNNNNN	18
10	Rand	ACTTCCGAGTCTGTAACC	18
11	Rand-compl	GGTTACAGACTCGGAAGT	18

Неспецифический синтез ДНК не протекал для термолабильных цв-ДНК-пол (Bsu, phi29, фрагмент Кленова) (табл. 2). Термостабильные ДНК-полимеразы (Vent *exo*⁻ и 9°Nm) демонстрировали наибольшую склонность к синтезу ДНК *ab initio*. В изотермических условиях данная способность проявилась у них для меньшего количества НК-матриц, но при циклировании почти все использованные НК привели к неспецифической амплификации. Стоит отметить, что характер накопления продуктов (скорость образования и количество) различался в зависимости от нуклеотидной последовательности матриц (рис. 1).

Электрофоретический анализ продуктов амплификации показал, что после проведения изотермической амплификации образуется набор ампликонов случайной длины (рис. 2А), в то время как после амплификации, проведенной в режиме термоциклирования, выявляются длинноцепочечные ДНК, не проникающие в гель (рис. 2Б). Последнее наблюдение объясняется, по-видимому, образованием ДНК с повторяющимися мотивами, которые в условиях циклирования обеспечивают формирование ДНК-агрегатов за счет множественного случайного отжига цепей. При обработке таких амплификатов ультразвуком в течение 30 мин происходит частичное разрушение ДНК, проявляющееся в геле в виде шмера с максимумом плотности около 100-200 п.о.

Оказалось, что наименьшей сиквенс-специфичностью обладает ДНК-полимераза 9°Nm:

данный фермент обеспечивал синтез ДНК при любых температурных режимах реакции и для широкого круга НК-матриц. В отдельных случаях при термоциклировании накопление ампликонов происходило сразу после начала реакции. Также высокой склонностью к синтезу ДНК *ab initio* обладает Vent *exo*⁻. Данные ферменты оказались единственными из тестированных, которые эффективно вели синтез в обоих температурных режимах.

Нуклеотидная последовательность матриц в целом также оказывала влияние на эффективность синтеза ДНК. В целом, по совокупности полученных данных, НК-структуры можно расположить в виде следующего ряда, отражающего предпочтительность их использования полимеразой для запуска синтеза ДНК:

дуплекс (Rand + Rand-compl) > dT₁₈ > Rand > d(CT)₉ > d(CG)₉ > d(AG)₉ > d(AT)₉ > dG₁₈ ≈ dA₁₈ ≈ dN₁₈ ≈ dC₁₈

С наибольшей скоростью синтез ДНК *ab initio* протекает при наличии в системе НК-дуплекса. Далее по способности запускать неспецифический синтез следует группа матриц, состоящих из динуклеотидных повторов, и замыкают ряд гомоолигонуклеотиды. Однако среди последних выделяется dT₁₈, который по способности инициировать синтез уступает лишь НК-дуплексу. Полностью вырожденный олигонуклеотид dN₁₈, в свою очередь, уступает олигонуклеотиду со случайной, но детерминированной последовательностью.

Таблица 2.

Значения порогового времени (Tt) и порогового цикла (Ct), полученные в ходе синтеза ДНК *ab initio*
 Table 2. Time-to-threshold (Tt) and threshold cycle (Ct) values obtained during *ab initio* DNA synthesis

№ No.	олигонуклеотид oligonucleotide	Vent exo ⁻		9°Nm		Hemo KlenTaq		Bst LF		Bsm		Bsu	phi29	Фрагмент Кленова Klenow	
		Tt*	Ct**	Tt	Ct	Tt	Ct	Tt	Ct	Tt	Ct			Tt	Tt
1	dA ₁₈	-	-	-	24±2	-	-	-	-	-	-	Tt	Tt	-	-
2	dC ₁₈	-	-	-	62±3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	dG ₁₈	-	43±4	21±0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	dT ₁₈	-	6±0	32±3	сразу	-	-	-	44±15	-	-	5±2	-	-	-
5	d(AG) ₉	67±11	28±2	78±5	5±0	-	72±24	-	-	-	-	-	-	-	-
6	d(CT) ₉	83±9	23±0	23±5	сразу	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	d(CG) ₉	63±7	10±0	-	14±1	-	58±16	-	-	-	-	-	-	-	-
8	d(AT) ₉	-	-	60±17	4±0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	dN ₁₈	-	-	-	50±3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	Rand	-	25±3	66±23	сразу	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	Rand + Rand- compl	30±4	сразу	7±2	сразу	-	65±19	-	-	-	-	-	-	-	-
12	- (контроль)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* Tt - пороговое время - начало подъема кривых амплификации при изотермическом режиме проведения реакции.

** Ct - пороговый цикл - начало подъема кривых амплификации в режиме термощлирования.

*** квази-изотермический режим ("падающее" щлирование в интервале 30-68 градусов).

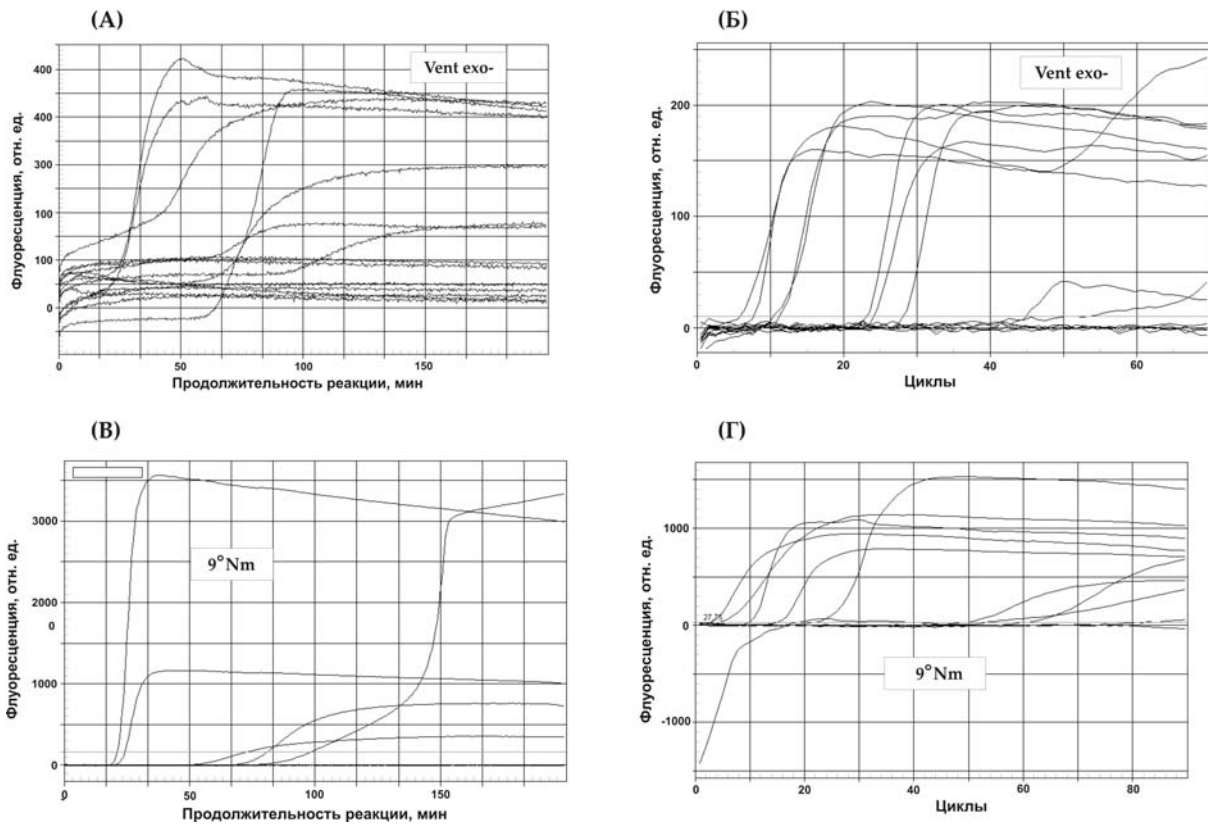


Рис. 1. Примеры кривых амплификации, полученных в ходе синтеза ДНК *ab initio*, для ДНК-полимераз Vent exo⁻ и 9°Nm при разных температурных режимах реакции.
 Fig. 1. Amplification curves obtained for Vent exo⁻ and 9°Nm polymerases at different temperature modes during *ab initio* DNA synthesis.

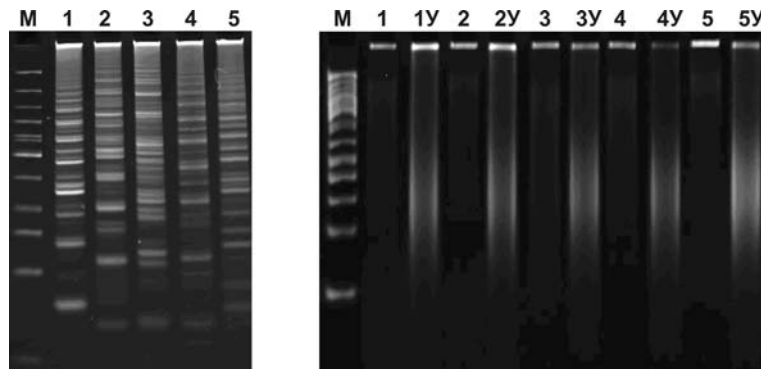


Рис. 2. Гель-электрофоретический анализ некоторых амплификатов, полученных при синтезе ДНК *ab initio* под действием ДНК-полимеразы 9°Nm: (А) продукты изотермической амплификации; (Б) продукты амплификации, проведенной в режиме термоциклирования: 1-5 - образцы непосредственно после амплификации, 1У-5У - амплификаты, обработанные ультразвуком (М - ДНК-маркер).
 Fig. 2. Gel-electrophoretic analysis of samples obtained during *ab initio* DNA synthesis with 9°Nm polymerase: (А) products of isothermal amplification; (Б) products of amplification carried out in the thermal cycling mode: 1-5 - samples immediately after amplification, 1У-5У - samples after sonication (М - DNA marker).

Попытки установить первичную структуру полученных ДНК-продуктов путем клонирования в различных плазмидных векторах не приводило к результату. В литературе имеются данные о сложном строении продуктов синтеза ДНК *ab initio*, что, вероятно, делает их непригодными для рутинного клонирования и секвенирования по Сэнгеру.

На основании известных данных (о способности полимеразы Bst *exo*⁻ вести мультимеризацию ДНК, о неспецифическом связывании фермента с цепями ДНК за счет ионных взаимодействий, о присоединении по 3'-концу растущей цепи преимущественно нуклеотида dA за счет нуклеотидилтрансферазной активности) и результатов, полученных при выполнении данного исследования, можно предположить следующий предварительный гипотетический пошаговый механизм синтеза ДНК *ab initio*:

- 1) При наличии в системе НК-структур, способных выступать затравками для синтеза цепей ДНК, полимеразы за счет своей нуклеотидилтрансферазной активности удлиняют их до размеров, при которых растущая цепь начинает "закручиваться" вокруг глобулы фермента.
- 2) По достижении оптимальных размеров НК-структур становится возможным сближение 3'-концевых участков цепей, их отжиг и начало элонгации образовавшихся гетеродуплексов.
- 3) Благодаря цепь-вытесняющей активности полимеразы вытесняют старую цепь и строят на ее месте новую, давая продукты, содержащие тандемные нуклеотидные повторы за счет мультимеризации.
- 4) С момента появления повторяющихся элементов реакция приобретает экспоненциальный характер, при этом эффективность синтеза резко возрастает при термоциклировании за счет денатурации и последующей ренатурации ДНК-продуктов, приводящей к образованию новых гетеродуплексов.

Предполагаемый гипотетический механизм синтеза ДНК *ab initio* требует, однако, проведения дальнейшего исследования.

Литература

1. Бикбулатова С.М., Чемерис Д.А., Никоноров Ю.М., Машков О.И., Гарафутдинов Р.Р., Чемерис А.В., Вахитов В.А. Способы детекции результатов полимеразной цепной реакции в режиме реального времени // Вестн. Башгосуниверситета. 2012. Т. 17(1). С. 59-67.

2. Гарафутдинов Р.Р., Галимова А.А., Сахабутдинова А.Р., Чемерис А.В. ПЦР-анализ специфичной к последовательности ультразвуковой фрагментации ДНК // Мол. биол. 2016. Т. 50. № 2. С. 272-278. <https://doi.org/10.7868/S0026898416020051>

3. Зырина Н.В., Антипова В.Н. Неспецифический синтез нуклеиновых кислот в реакциях изотермической амплификации // Биохимия. 2021. Т. 86. № 7. С. 1066-1077. <https://doi.org/10.1134/S0006297921070099>

4. Сахабутдинова А.Р., Мирсаева Л.Р., Оскорбин И.П., Филипенко М.Л., Гарафутдинов Р.Р. Устранение мультимеризации ДНК, возникающей при изотермической амплификации в присутствии ДНК полимеразы Bst *EXO*⁻ // Биоорг. химия. 2020. Т. 46. С. 56-64. <https://doi.org/10.1134/S1068162020010082>

5. Чемерис А.В., Магданов Э.Г., Гарафутдинов Р.Р., Вахитов В.А. Как исключить появление ложнопозитивных результатов при проведении полимеразной цепной реакции? // Вестн. биотехнол. физ.-хим. биол. 2012. Т. 8(3). С. 34-45.

6. Чемерис А.В., Чемерис Д.А., Магданов Э.Г., Гарафутдинов Р.Р., Нагаев Н.Р., Вахитов В.А. Причины ложно-негативной ПЦР и недопущение некоторых из них // Биомика. 2012. Т. 4(1). С. 31-47.

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(1). С. 1-8.

8. Antipova V.N., Zheleznaya L.A., Zyrina N.V. *Ab initio* DNA synthesis by Bst polymerase in the presence of nicking endonucleases Nt.A1wI, Nb.BbvCI, and Nb.BsmI // FEMS Microbiol. Lett. 2014. V. 351. P. 1-6. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12511>

9. Bukasov R., Dossym D., Filchakova O. Detection of RNA viruses from influenza and HIV to Ebola and SARS-CoV-2: a review // Anal. Methods. 2021. V. 13. PP. 34-55. <https://doi.org/10.1039/d0ay01886d>

10. Garafutdinov R.R., Galimova A.A., Sakhabutdinova A.R. The influence of CpG methylation on ultrasonic DNA fragmentation // J. Biomol. Struct. Dyn. 2019. V. 37. P. 3877-3886. <https://doi.org/10.1080/07391102.2018.1533888>

11. Garafutdinov R.R., Gilvanov A.R., Kupova O.Y., Sakhabutdinova A.R. Effect of metal ions on isothermal amplification with Bst *exo*⁻ DNA polymerase // Int. J. Biol. Macromol. 2020. V. 161. P.1447-1455. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.028>

12. Garafutdinov R.R., Gilvanov A.R., Sakhabutdinova A.R. The influence of reaction conditions on DNA multimerization during isothermal amplification with Bst DNA polymerase // Appl. Biochem. Biotechnol. 2020. V. 190. P. 758-771. <https://doi.org/10.1007/s12010-019-03127-6>

13. Garafutdinov R.R., Sakhabutdinova A.R., Kupryushkin M.S., Pyshnyi D.V. Prevention of DNA

multimerization during isothermal amplification with Bst exo- DNA polymerase // *Biochimie*. 2020. V. 168. P. 259-267. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.11.013>

14. Ogata N., Miura T. Creation of genetic information by DNA polymerase of the archaeon *Thermococcus litoralis*: influences of temperature and ionic strength // *Nucleic Acids. Res.* 1998. V. 26. P. 4652-4656. <https://doi.org/10.1093/nar/26.20.4652>

15. Ogata N., Miura T. Creation of genetic information by DNA polymerase of the thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* // *Nucleic Acids. Res.* 1998. V. 26. P. 4657-4661. <https://doi.org/10.1093/nar/26.20.4657>

16. Ogata N., Miura T. Genetic information 'created' by archaeobacterial DNA polymerase // *Biochem. J.* 1997. V. 324. P. 667-671. <https://doi.org/10.1042/bj3240667>

17. Packer M.J., Dauncey M.P., Hunter C.A. Sequence-dependent DNA structure: dinucleotide conformational maps // *J. Mol. Biol.* 2000. V. 295. P. 71-83. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3236>

18. Qian J., Ferguson T.M., Shinde D.N., Ramírez-Borrero A.J., Hintze A., Adami C., Niemz A. Sequence dependence of isothermal DNA amplification via EXPAR // *Nucleic Acids Res.* 2012. V. 40. e87. <https://doi.org/10.1093/nar/gks230>

19. Rolando J.C., Jue E., Barlow J.T., Ismagilov R.F. Real-time kinetics and high-resolution melt curves in single-molecule digital LAMP to differentiate and study specific and non-specific amplification // *Nucleic Acids Res.* 2020. V. 48(7). e42. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa099>

20. Sakhabutdinova A.R., Kamalov M.I., Salakhieva D.V., Mavzyutov A.R., Garafutdinov R.R. Inhibition of nonspecific polymerase activity using poly(aspartic) acid as a model anionic polyelectrolyte // *Anal. Biochem.* 2021. V. 628. P. 114267. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2021.114267>

References

1. Antipova V.N., Zheleznyaya L.A., Zyrina N.V. Ab initio DNA synthesis by Bst polymerase in the presence of nicking endonucleases Nt.AlwI, Nb.BbvCI, and Nb.BsmI. *FEMS Microbiol. Lett.* 2014. V. 351. P. 1-6. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12511>

2. Bikbulatova S.M., Chemeris D.A., Nikonorov Yu.M., Mashkov O.I., Garafutdinov R.R., Chemeris A.V., Vakhitov V.A. Methods for detection of real time polymerase chain reaction results. *Vestn. Bashkir State University.* 2012. V. 17(1). pp. 59-67.

3. Bukasov R., Dossym D., Filchakova O. Detection of RNA viruses from influenza and HIV to Ebola and SARS-CoV-2: a review. *Anal. Methods.* 2021. V. 13. PP. 34-55. <https://doi.org/10.1039/d0ay01886d>

4. Chemeris A.V., Chemeris D.A., Magdanov E.G., Garafutdinov R.R., Nagaev N.R., Vakhitov V.A. Causes of false-negative PCR and prevention of some of them. *Biomics.* 2012. V. 4(1). P. 31-47.

5. Chemeris A.V., Magdanov E.G., Garafutdinov R.R., Vakhitov V.A. How to exclude the appearance of false-positive results during the polymerase chain reaction? *Vestn. biotechnol. fiz.-chem. biol.* 2012. V. 8(3). P. 34-45.

6. Chemeris D.A., Magdanov E.G., Mashkov O.I., Garafutdinov R.R., Chemeris A.V. Delayed or hot-start PCR. *Biomics.* 2011. V. 2(1). P. 1-8.

7. Garafutdinov R.R., Galimova A.A., Sakhabutdinova A.R. The influence of CpG methylation on ultrasonic DNA fragmentation. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2019. V. 37. P. 3877-3886. <https://doi.org/10.1080/07391102.2018.1533888>

8. Garafutdinov R.R., Galimova A.A., Sakhabutdinova A.R., Chemeris A.V. PCR analysis of sequence-specific ultrasonic DNA fragmentation. *Mol. biol.* 2016. V. 50(2). P. 272-278. <https://doi.org/10.7868/S0026898416020051>

9. Garafutdinov R.R., Gilvanov A.R., Kupova O.Y., Sakhabutdinova A.R. Effect of metal ions on isothermal amplification with Bst exo- DNA polymerase. *Int. J. Biol. Macromol.* 2020. V. 161. P. 1447-1455. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.028>

10. Garafutdinov R.R., Gilvanov A.R., Sakhabutdinova A.R. The influence of reaction conditions on DNA multimerization during isothermal amplification with Bst DNA polymerase. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2020. V. 190. PP. 758-771. <https://doi.org/10.1007/s12010-019-03127-6>

11. Garafutdinov R.R., Sakhabutdinova A.R., Kupryushkin M.S., Pyshnyi D.V. Prevention of DNA multimerization during isothermal amplification with Bst exo- DNA polymerase. *Biochimie.* 2020. V. 168. P. 259-267. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.11.013>

12. Ogata N., Miura T. Creation of genetic information by DNA polymerase of the archaeon *Thermococcus litoralis*: influences of temperature and ionic strength. *Nucleic Acids. Res.* 1998. V. 26. P. 4652-4656. <https://doi.org/10.1093/nar/26.20.4652>

13. Ogata N., Miura T. Creation of genetic information by DNA polymerase of the thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* // *Nucleic Acids. Res.* 1998. V. 26. P. 4657-4661. <https://doi.org/10.1093/nar/26.20.4657>

14. Ogata N., Miura T. Genetic information 'created' by archaeobacterial DNA polymerase. *Biochem. J.* 1997. V. 324. P. 667-671. <https://doi.org/10.1042/bj3240667>

15. Packer M.J., Dauncey M.P., Hunter C.A. Sequence-dependent DNA structure: dinucleotide conformational maps. *J. Mol. Biol.* 2000. V. 295. P. 71-83. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3236>

16. Qian J., Ferguson T.M., Shinde D.N., Ramírez-Borrero A.J., Hintze A., Adami C., Niemz A. Sequence dependence of isothermal DNA amplification via EXPAR. *Nucleic Acids Res.* 2012. V. 40. e87. <https://doi.org/10.1093/nar/gks230>

17. Rolando J.C., Jue E., Barlow J.T., Ismagilov R.F. Real-time kinetics and high-resolution melt curves in single-molecule digital LAMP to differentiate and study

- specific and non-specific amplification. *Nucleic Acids Res.* 2020. V. 48(7). e42. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa099>
18. Sakhabutdinova A.R., Kamalov M.I., Salakhieva D.V., Mavzyutov A.R., Garafutdinov R.R. Inhibition of nonspecific polymerase activity using poly(aspartic) acid as a model anionic polyelectrolyte. *Anal. Biochem.* 2021. V. 628. P. 114267. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2021.114267>
19. Sakhabutdinova A.R., Mirsaeva L.R., Garafutdinov R.R., Oscorbin I.P., Filipenko M.L. Elimination of DNA multimerization arising from isothermal amplification in the presence of Bst exo- DNA polymerase. *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2020.V. 46. P. 52-59. <https://doi.org/10.1134/S1068162020010082>
20. Zyrina N.V., Antipova V.N. Nonspecific synthesis of nucleic acids during isothermal amplification reactions. *Biochemistry (Mosc)*. 2021. V. 86(7). P. 1066-1077. <https://doi.org/10.1134/S0006297921070099>