



ПЦР С ОТЛОЖЕННЫМ (ГОРЯЧИМ ИЛИ ЗАДЕРЖАННЫМ) СТАРТОМ

Чемерис Д.А., Магданов Э.Г., Машков О.И., Гарафутдинов Р.Р., Чемерис А.В.

Учреждение Российской академии наук Институт биохимии и генетики
Уфимского научного центра РАН, Уфа, chemeris@anrb.ru

Резюме

Исторически сложилось так, что сначала появилось выражение «ПЦР с горячим стартом» (hot start PCR), которое указывало на использование относительно высокой температуры на фактически предстартовом этапе ПЦР. Позднее появившееся понятие «ПЦР с задержанным стартом» (PCR time release), уже подчеркивало важность и других компонентов реакции, временное исключение которых приводило также к «задержке» старта ПЦР (момента начала непосредственного образования ампликонов) и повышало специфичность реакции. В статье в хронологическом порядке рассматриваются способы ПЦР с отложенным стартом, сдерживающих до определенного момента или работу ДНК полимеразы или отжиг праймеров.

Ключевые слова: ПЦР, «горячий» старт, отложенный старт, ДНК полимеразы, праймер, дНТФ, ионы магния

Полагая, что все, кого заинтересует данная статья, достаточно хорошо знакомы с основными принципами полимеразной цепной реакции (ПЦР), не видим необходимости описывать их здесь. При этом некоторые особенности проведения ПЦР, включая «горячий» старт, могут быть известны не всем. Исходя из этого, было принято решение изложить, по возможности, в хронологическом порядке различные варианты стартового момента ПЦР, включая как нашедшие широкое применение, так и оставшиеся практически невостребованными. В большинстве случаев проведение ПЦР не требует использования «горячего» старта, однако амплификация так называемых «трудных» матриц идет значительно лучше, если использовать отложенный старт, благодаря которому ДНК полимеразы не начинают работать, пока температура реакционной смеси, пройдя момент первоначальной денатурации молекул ДНК, не опустится до оптимальной температуры отжига праймеров.

Исторически сложилось так, что сначала возникло выражение «ПЦР с горячим стартом» (hot start PCR), говорящее об использовании относительно высокой температуры на предстартовом этапе ПЦР. Позднее появившееся понятие «ПЦР с задержанным стартом» (PCR time release), уже подчеркивало важность и других компонентов и параметров реакции (помимо температуры), которые также приводили к

намеренной искусственной «задержке» старта ПЦР (момента начала накопления ампликонов) и повышали специфичность реакции. Причем в этих случаях высокая температура уже не является обязательным условием (как определяющий фактор) для проведения высокоспецифичной ПЦР – имеются способы, где подготовка к амплификации (тот самый «горячий» старт в широком смысле этого словосочетания), например в виде «выключения/включения» различных компонентов реакции, (ДНК полимеразы, праймеров), можно осуществить иначе, и изменение температуры (на этом начальном этапе) лишь синхронизирует процесс по времени.

Что подразумевается, когда говорят о высокоспецифичной ПЦР? Под это определение подпадает ситуация, означающая, что если в матрице имеется интересующая исследователя нуклеотидная последовательность, то в ходе высокоспецифичной ПЦР, будет происходить амплификация именно этих участков, а не каких-либо других. Когда такой последовательности в анализируемом образце нет, ПЦР вообще не должна будет идти, точнее, никаких ампликонов образовываться не должно.

Иногда при амплификации тех или иных участков нуклеиновых кислот проблема специфичности реакции стоит довольно остро. Главными причинами являются особенности

искомых нуклеотидных последовательностей и некоторое несовершенство праймеров (которые, впрочем, иногда и не могут быть выбраны иными¹, более пригодными для специфичной амплификации), а также то, что используемые в ПЦР термостабильные ДНК полимеразы, имеющие оптимум ферментативной активности обычно около 70°C, способны и при комнатной температуре строить новую цепь ДНК, хотя и со значительно меньшей скоростью. В результате такого действия ДНК полимераз образуются «испорченные» праймеры или неспецифичные фрагменты ДНК, построенные с отжигшихся не в нужном месте праймеров.

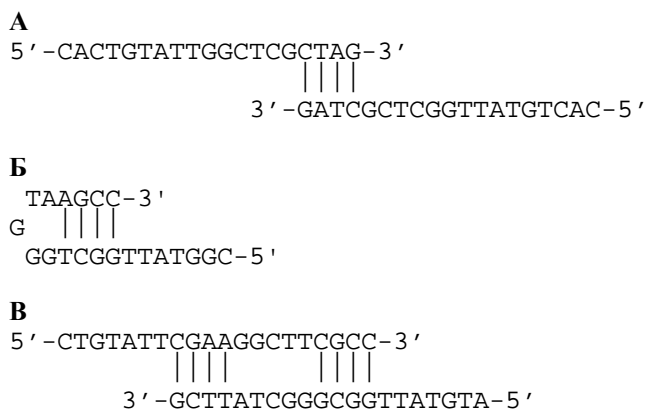


Рис. 1. Способные к элонгации праймерные структуры. **А** – самоотжиг праймера с интрагомологией. **Б** – шпильчатая структура праймера с внутренней интрагомологией. **В** – димер прямого и обратного праймеров, имеющих интергомологию

Как видно из рис. 1, возникновение при пониженной температуре праймерных димеров или шпильчатых структур из праймеров в некоторых случаях (при образовании способного к удлинению по возникающей матрице 3'-конца) способно привести к достройке одного или большего числа нуклеотидов, не гомологичных искомой последовательности.²

Отжиг праймеров (по крайней мере, части их последовательности, включающей 3'-конец) в незапланированном месте приводит к тому, что образуются неспецифичные гетерогенные по длине ампликоны. В результате неспецифического отжига, приобрета на своих концах праймеры, такие матрицы в дальнейшем легко вовлекаются в цепную

¹ Когда требуется амплифицировать конкретный участок ДНК, например, полноразмерный ген, то места отжига праймеров и сами их последовательности фактически предопределены заранее самой Природой.

² По теории вероятности эти достраиваемые ДНК полимеразой нуклеотиды могут быть и комплементарны целевой матрице и как бы лишь удлинит сам праймер, который продолжит оставаться специфичным, но это почти невозможное событие особенно при достройке значительного числа нуклеотидов.

реакцию амплификации, поскольку всего через цикл эти нуклеотидные последовательности станут уже полноценным местом отжига для тех же праймеров. Из вышесказанного следует, что для повышения специфичности ПЦР необходимо не позволить термофильной ДНК полимеразе проявлять свою ферментативную активность при низкой температуре, при которой праймеры способны образовывать праймерные димеры, шпильки или отжигаться неспецифично. Такое происходит ввиду того, что при такой (низкой) температуре для формирования двойной спирали оказывается достаточно энергии образующихся водородных связей между относительно небольшим количеством азотистых оснований. Другой подход заключается при наличии в реакционной смеси активной ДНК полимеразы недопущения при пониженных температурах отжига праймеров (точнее их частей) самих на себя или на неспецифических участках. Для обоих подходов повышения специфичности ПЦР с временным выключением работы ДНК полимеразы или с недопущением неспецифического отжига праймеров разработано множество вариантов, к рассмотрению которых мы и переходим.

Как известно, для протекания ПЦР, помимо соответствующих условий в виде циклических изменений температуры реакционной смеси, требуется наличие в последней, помимо растворителя (воды и буфера с подходящим рН) и иногда некоторых добавок (ДМСО, бетаина и др.), также основных определяющих компонентов ПЦР (термостабильная ДНК полимераз, дНТФ, праймер(ы), ионы магния, матричная ДНК или РНК). И чтобы не дать возможность ДНК полимеразе строить комплементарную цепь ДНК по неспецифической матрице, включая сами праймеры, для повышенной специфичности ПЦР необходимо временное исключение или управляемое инактивирование одного или большего числа этих основных компонентов. Это позволяет экспериментатору производить смешивание реагентов при комнатной температуре спокойно, без опасения произвольного «старта» реакции, чтобы повысить температуру реакционной смеси до температуры денатурации исходной ДНК и затем уже не опускать ее ниже оптимальной для отжига подобранных праймеров.

Как это ни удивительно, но с момента разработки ПЦР с термостабильной ДНК полимеразой [Mullis, Faloona, 1987] и активного применения этого метода потребовалось несколько лет, прежде чем всерьез задумались о повышении для некоторых трудных случаев специфичности данной реакции.³ Летом 1991 года практически одновременно появились две работы, в которых авторы предложили решение проблемы

³ Впервые об использовании для повышения специфичности ПЦР «горячего старта» было доложено в 1990 г. на международной конференции в Сан-Франциско [Faloona et al., 1990, цит. по Birch et al., 1996].

неспецифической амплификации в ПЦР. Так, автор метода ПЦР К.Мюллис в своей статье упомянул о возможности исключения из реакционной смеси дНТФ пока температура жидкости не опустится (после стартового этапа денатурации ДНК) до 80°C [Mullis, 1991]. Безусловно, исключение этого важного ингредиента блокировало построение новых цепей ДНК (фактически выключало ДНК полимеразу), но для добавления дНТФ в нужный момент необходимо было, пусть и в самом начале, фактически останавливать реакцию, вручную внося раствор дНТФ под слой минерального масла, что при массовых анализах неприемлемо. Более простой вариант был предложен другими авторами [D'Aquila et al., 1991], которые не останавливали реакцию, а сразу составляли реакционную смесь при повышенной (70°C) температуре, что при массовых анализах тоже несколько проблематично из-за происходящего ускоренного испарения жидкости. При немассовых постановках ПЦР оба варианта до сих пор применяются с той лишь разницей, что вместо дНТФ из реакции могут исключаться и другие ингредиенты, например, ДНК полимеразы или праймеры.

Прежде чем перейти к описанию барьерного способа обеспечения «горячего» старта все же следует вспомнить, что для исключения испарения реакционной смеси при проведении ПЦР в ранних моделях ДНК-термоциклеров, не имеющих так называемой «горячей крышки», необходимо было на водную фазу добавлять легкое минеральное масло, формирующее верхний слой, непроницаемый для паров воды. В 1992 г. было предложено вместо минерального масла использовать специальную смесь парафинов [Chou et al., 1992], получившую название AmpliWax и поставляемую в то время американской фирмой Perkin-Elmer Cetus Instruments. В разделе «Благодарности» той статьи выражалась признательность сотруднику фирмы Cetus F.Faloon, предложившему использовать «горячий старт» для повышения специфичности ПЦР, и сообщалось также, что первым использовать полужидкий углеводород для создания водонепроницаемого барьера предложил сотрудник той же фирмы J.Raymond. С целью замены дорогостоящего⁴ коммерческого продукта AmpliWax исследовались различные парафины с подходящей температурой плавления производства целого ряда фирм [Sparkman, 1992]. Причем в цитируемой работе отмечалось, что применение парафина решает сразу две задачи, поскольку исключает последующую хлороформную обработку реакционной смеси для удаления масла, так как после охлаждения и затвердевания парафина его можно просто проколоть наконечником пипетки для забора жидкости, которая может сразу непосредственно использоваться для дальнейшей работы, а во-вторых, тот же парафин является искусственным барьером для паров воды и позволяет использовать «горячий» старт. Позднее

другим автором был опробован для этих же целей парафин еще одной фирмы и сделан даже расчет, показавший, что удорожание ПЦР в расчете на одну пробирку в этом случае составляет всего около одной десятитысячной фунта стерлингов [Cooke, 1992]. Дешевые заменители AmpliWax искали и другие экспериментаторы [Hebert et al., 1993; Wainwright, Seifert, 1993], в том числе и один из авторов данной обзорной статьи перебирал различные углеводороды и их смеси [А.В.Чемерис, неопубликовано]. С целью удешевления ПЦР с «горячим» стартом предлагалось использовать вместо AmpliWax вместе с минеральным маслом и аптечный вазелин [Horton et al., 1994]. Описана замена AmpliWax формируемой на холоду (предпочтительно на льду) трехфазной системой с тяжелым минеральным маслом [Riol et al., 1994]. В одной из работ упоминалось о возможности использования масляно-парафинового барьера для длительного хранения образцов [Bassam, Caetano-Anolles, 1993], причем в этой же работе также испытывались различные парафины, и отмечалось, что отсутствующим реагентом на стадии смешивания часто служат не дНТФ или ДНК полимеразы, а праймеры или матрица.

Серьезным недостатком барьерного метода для обеспечения «горячего» старта ПЦР в его описанном выше можно сказать классическом (подразумевая, что он был первым) варианте является необходимость предварительного расплавления и последующего затвердевания парафинового слоя. Только после этого на него сверху можно добавлять недостающие ингредиенты и для исключения их испарения покрывать все слоем легкого минерального масла. Мощной альтернативой такому барьерному методу проведения ПЦР с «горячим» стартом стало использование термостабильной ДНК полимеразы, заключенной в парафиновые гранулы и таким образом фактически изолированную до нужного момента из реакционной смеси [Kaijalainen et al., 1993]. Высушиваемая для этой цели в присутствии трегалозы ДНК полимеразы хорошо сохраняла свои свойства [Colaco et al., 1992]. В настоящее время американской фирмой Promega производятся гранулы TaqBead, представляющие собой Таq полимеразу, инкапсулированную в парафиновую оболочку, где парафин является барьером между ДНК полимеразой и остальными ингредиентами ПЦР смеси [Kosak K.M., Kosak M.K., 1995].

Предложены и другие способы временного «выключения» ДНК полимеразы. Одним из наиболее широко используемых стал вариант блокирования работы термостабильной Таq полимеразы моноклональными антителами [Kellog et al., 1994; Sharkey et al., 1994]. Причем в последней из цитируемых здесь работ упоминается об ингибировании помимо Таq полимеразы и других термостабильных ДНК полимераз, выделенных из близкородственных *Thermus aquaticus* бактерий – *T.thermophilus*, *T.flavus* и *T.filiformis*. Принцип действия отложенного или задержанного старта ПЦР с антителами заключается в том, что

⁴ Тогдашняя стоимость AmpliWax составляла 125 долларов США на 200 реакций.

нетермостабильные антитела, связываясь с ДНК полимеразой при комнатной температуре, ингибируют ее работу, но после повышения температуры происходит их денатурация и потеря связи с ДНК полимеразой, которая, освободившись от этих белков, начинает проявлять свою ферментативную активность. В настоящее время для обеспечения такого варианта «горячего» старта в ПЦР довольно много фирм производят несколько отличающиеся Taq полимеразы в комплексе с моноклональными антителами. Некоторым недостатком данного подхода является то, что используемых в ПЦР ДНК полимераз довольно много разных, причем выделяемых из далеко отстоящих на эволюционной лестнице микроорганизмов, и для почти каждого такого фермента было бы необходимо готовить свои антитела, что довольно трудоемко и поэтому таковые к другим термостабильным ДНК полимеразам практически отсутствуют. Пожалуй, единственным исключением является коммерчески реализуемая японской фирмой Toyobo ДНК полимеразы из *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1, о получении моноклональных антител к которой сообщено уже довольно давно [Mizuguchi et al., 1999].

Можно считать, что некими аналогами белковых антител служат аптамеры⁵, имеющие нуклеиновую природу, и хотя они более подходят для связывания небольших лигандов имеются сообщения о связывании ими и белковых молекул. Так, обнаружен целый ряд олигонуклеотидных последовательностей, которые ингибируют работу термостабильных ДНК полимераз при низкой (комнатной) температуре, обеспечивая задержку старта ПЦР, но стоит температуре повыситься, как вторичная структура аптамеров меняется и они оказываются более неспособными связываться с ДНК полимеразой и последние начинают проявлять свою активность [Dang, Jayasena, 1996; Lin, Jayasena, 1997; Gold, Jayasena, 1998]. Поскольку аптамеры являются одноцепочечными и довольно протяженными олигонуклеотидами, то они способны при невысоких температурах формировать относительно сложные вторичные структуры, «узнающие» и связывающиеся с теми или иными анализитами или отдельными эпитопами и это не очень удивительно. В этой связи особняком стоит работа других авторов [Kainz et al., 2000], обнаруживших, что некоторые короткие, уже только двухцепочечные молекулы ДНК способны ингибировать работу термостабильных ДНК полимераз из микроорганизмов *T.aquaticus* и *T.flavus*, производя тем самым эффект отложенного старта ПЦР.

С некоторых пор популярными для ПЦР с задержкой стартового момента стали химически модифицированные ДНК полимеразы, поставляемые американской фирмой Applied

Biosystems под торговыми марками AmpliTaq и AmpliTaq Gold. Особенностями запатентованных химически измененных ферментов является то, что остатки лизина в них обратимо модифицированы каким-либо подходящим ангидридом – обычно цитраконовым или цис-аконитовым [Birch et al., 1998]. При нагреве в водной среде за 5 - 10 мин происходит отщепление ангидридной группировки, и фермент приобретает свойственную ему полимеризующую активность. Во многих статьях отмечается удобство этого процесса и то, что ПЦР с «горячим» стартом с использованием таких химически модифицированных ДНК полимераз обеспечивает высокоспецифичную амплификацию [Birch et al., 1996; Kebelmann-Betzing et al., 1998; Moretti et al., 1998; Zimmermann, Mannhalter, 1998]. На несколько отличающийся способ инактивации термостабильных ДНК полимераз и лигаз теми же ангидридами позже был выдан и другой американский патент [Louwrier, 2002].

Иной способ активации термостабильной ДНК полимеразы высокой температурой описан шведскими и норвежскими авторами [Nilsson et al., 1997]. Ими было обнаружено, что иммобилизованная на HSA-сефарозе аффинным способом Taq ДНК полимеразы, слитая с меткой в виде шести остатков гистидина и получившая обозначение TagTaq, практически неактивна при низкой температуре. При этом авторы признают, что механизм ингибирования не до конца понятен и может вызываться связыванием гистидинами ионов металлов (магния), но при повышении температуры происходит высвобождение ДНК полимеразы (десорбция) с восстановлением ее активности, что и обеспечивает «горячий» старт.

Несколько холодо-чувствительных мутантов ранее укороченной по N-концу Taq полимеразы (KlenTaq) удалось создать американским авторам [Kermekchiev et al., 2003]. Они обнаружили, что произведенные ими замены четырех аминокислот (W706R, E708D, E626K и I707L) приводят к тому, что при 37°C мутантные ДНК полимеразы практически не проявляют своей активности, а при 68°C обладают стандартной активностью и при этом выдерживают продолжительный нагрев до 95°C.

Относительно недавно в ПЦР с отложенным стартом «проникла» нанотехнология в виде коллоидных наночастиц золота. Так, китайскими авторами было обнаружено, что предварительная инкубация Pfu полимеразы с наночастицами золота повышает специфичность ПЦР, приводя к эффекту «горячего» старта, поскольку после такой обработки при низких температурах термостабильная ДНК полимеразы была неактивна [Mi et al., 2009]. Авторы высказали предположение, что наночастицы золота выступают в качестве наношаперонов и динамически взаимодействуют с ДНК полимеразой. Нам кажется, что, скорее всего, имеет место взаимодействие серосодержащих аминокислот с золотом, что и приводит к обратимому, зависимому от температуры ингибированию работы ДНК полимеразы. Несмотря на то, что в цитируемой

⁵ Аптамерам и методам их получения с помощью ПЦР будет посвящена отдельная статья в одном из последующих номеров журнала.

работе была исследована только одна термостабильная Pfu полимеразы данный подход теоретически может быть универсальным, поскольку любая ДНК полимеразы несет немало (несколько десятков) аминокислотных остатков, содержащих серу, а в добавлении к исходному раствору подходящей ДНК полимеразы наночастиц коллоидного золота нет никаких сложностей. Ранее этой же группой авторов [Mi et al., 2007], а также другими [Li et al., 2005] было показано, что присутствие в реакционной смеси коллоидного золота улучшает и ускоряет протекание ПЦР отчасти благодаря более быстрой смене температур, поскольку золото выступает хорошим проводником поступающего извне тепла.

Поскольку ДНК полимеразы являются магний-зависимыми ферментами, то временное исключение из реакционной смеси этого иона также приводит к прекращению работы ДНК полимеразы. В литературе описано несколько способов, благодаря которым ионы магния становятся на определенное время недоступными. Так, в 2002 г. было предложено вместо обычно используемого хлористого магния добавлять в реакционную смесь гораздо хуже растворяющийся фосфат магния [Barnes, Rowlyk, 2002]. В результате была обеспечена ПЦР с «горячим» или отложенным стартом, поскольку только к третьему циклу из-за медленно, но все же растворявшегося при повышенной температуре фосфата магния количество ионов этого металла становилось достаточным для эффективной работы фермента. Позднее отечественными учеными [Игнатов и др., 2003] была опубликована подобная работа, где в качестве источника магния предлагалось использовать его малорастворимый оксалат, поскольку растворимость щавелевокислого магния зависит от температуры и заметно растет при нагреве. Совсем недавно выдан патент США [Ankenbauer et al., 2011], в котором патентуется способ ПЦР с отложенным или «горячим» стартом, где ионы магния связываются при комнатной температуре короткими (до 30 аминокислот) пептидами, высвобождающимися магний при повышении температуры.

Еще одним способом «не позволить» ДНК полимеразе проявить свою полимеризующую активность является отсутствие «строительного» материала в виде дНТФ, что еще в 1991 г. предлагал К.Мюллис [Mullis, 1991]. Оптимальным способом обеспечения «горячего» или отложенного старта является временное «отсутствие» дНТФ, пригодных в качестве субстратов для ДНК полимеразы и такие модифицированные дНТФ в виде различных производных были синтезированы [Koukhareva et al., 2008; Lebedev et al., 2009]. При этом наилучшие результаты в ПЦР показали производные дНТФ с тетрагидрофураном, отщепляющимся при повышенной температуре. На основе этих разработок американская фирма TriLink Biotechnologies, Inc. в настоящее время выпускает различные наборы производных дНТФ под общим названием CleanAmp dNTPs, позволяющие

осуществлять амплификацию трудных матриц, в том числе и мультиплексную ПЦР [Le, Paul, 2009; Le et al., 2009].

Одним из простых путей исключить формирование способных к элонгации праймерных димеров или самоудлинение одного из праймеров (или даже обоих) из-за их интрагомологии является создание запрограммированных шпилечных структур. Так, практически одновременно были опубликованы две статьи, описывающие подобное устройство праймеров, которые при повышении температуры лишались своей вторичной структуры и были готовы специфично отжигаться строго на намеченных местах [Ailenberg, Silverman, 2000; Kaboev et al., 2000]. Позже были предложены для «горячего» старта дуплексные двухцепочечные праймеры, которые представляли собой два одинаковой длины одноцепочечных олигонуклеотида, но один из них (нерабочий) имел один или несколько неспариваемых нуклеотидов и к тому же был блокирован фосфатной группой на 3'-конце для невозможности его удлинения ДНК полимеразой [Kong et al., 2004]. Справедливости ради следует отметить, что ранее в 2002 г. была опубликована статья [Li et al., 2002], посвященная, главным образом, двухцепочечным гибридным пробам, основанным на специфическом смещении, где кратко упоминается о возможности использования для ПЦР с «горячим» стартом таких двухцепочечных праймеров.

Управляемую светом ПЦР предложила группа американских авторов [Young et al., 2008]. Ими были синтезированы праймеры, содержащие несколько остатков тимидинов, заключенных, образно говоря, в некую клетку, мешающую спариванию (оказалось, что достаточно трех таких тимидинов на 18-ти звенный праймер). После обработки длинноволновым УФ-светом в течение 8 мин экранирующие группы удалялись и праймер приобретал способность к отжигу. При этом авторы выразили в своей статье надежду, что для реализации отложенного старта обеспечить облучение образцов ультрафиолетом в самом ДНК термоциклере с оптическим модулем не составит серьезной проблемы и при желании производителей может быть легко осуществлено. Более перспективный вариант временной недоступности праймеров для действия ДНК полимеразы заключается в наличии блокирующих 3'-конец праймера подходящих групп, которые могут быть удалены высокой температурой (что легко осуществимо уже в любом ДНК термоциклере), обеспечивая тем самым «горячий» отложенный старт ПЦР [Lebedev et al., 2008; Ashrafi, Paul, 2009]. Важным моментом является то, что такие праймеры с удаляемой высокой температурой блокирующей группой на 3'-конце синтезируются на заказ уже упоминавшейся выше американской фирмой TriLink Biotechnologies, Inc.

В одной работе [Nuovo et al., 1993] было показано, что добавление термостабильного SSB (single-stranded binding)-белка *E.coli* улучшало протекание ПЦР за счет исключения

неспецифичности отжига праймеров. Позже в другой работе описан «горячий» старт в ПЦР, обеспечивающийся присутствием термостабильной ДНК-геликазы, которая, по мнению авторов, на этапе формирования реакционной смеси расплетала образующиеся дуплексы праймер/праймер и праймер/матрица, а после этапа денатурации разрушалась и не влияла на дальнейшее протекание ПЦР [Кабоев и др. 1999].

Таким образом, исходя из вышеизложенного, можно заключить, что для обеспечения «горячего» или задержанного старта в ПЦР с целью повышения в отдельных трудных случаях специфичности процесса амплификации предложено множество способов, ряд из которых нашли свое применение и соответствующие компоненты ПЦР для них производятся различными специализированными фирмами. Собственно отложенный старт в ПЦР с успехом может применяться и для амплификации любых матриц, улучшая эффективность процесса и лишь незначительно увеличивая время всей реакции.

Безусловно, к более удобным и перспективным способам проведения высокоспецифичной ПЦР с отложенным стартом следует отнести те, где не требуется принудительная остановка реакции, поскольку доступность компонентов ПЦР подходящим способом достигается в ходе самого процесса амплификации. Однако, учитывая современные тенденции резкого сокращения продолжительности ПЦР, те лишние минуты, что требуются на «снятие» тех или иных блокирующих отжиг (включая самоотжиг) праймеров или работу ДНК полимераз соответствующих групп, молекул или наночастиц, могут быть продолжительнее всей реакции, осуществляемой, например, в микрофлюидных устройствах, где применяются совсем иные подходы к обеспечению отложенного старта, которые будут нами описаны в специальной статье, посвященной микрофлюидным способам амплификации нуклеиновых кислот.

Помимо «горячего» отложенного старта, высокая специфичность ПЦР при амплификации «трудных» матриц (и не только «трудных») зависит также и от других важных моментов, среди которых недопущение попадания из предыдущих реакций во вновь формируемые реакционные смеси ранее поработавших ампликонов или «стерилизация» таковых, для чего также существует немало разработанных оригинальных подходов, что является уже предметом отдельной статьи в следующем номере журнала.

Литература

1. Игнатов К.Б., Мирошников А.И., Крамаров В.М. Новый подход к увеличению специфичности ПЦР // Биоорган. химия. 2003. Т.29. С.403-407.
2. Кабоев О.К., Шевелев И.В., Лучкина Л.А., Третьяков А.Н., Щербакова О.Г. Горячий старт полимеразной цепной реакции при помощи ДНК-геликаз // Биоорган. химия. 1999. Т.25. С.398-400.
3. Ailenberg M., Silverman M. Controlled hot start and improved specificity in carrying out PCR utilizing touch-up and loop incorporated primers (TULIPS) // Biotechniques. 2000. V.29. P.1018-1020, 1022-1024.
4. Ankenbauer W., Heindl D., Laue F. PCR hot start by magnesium sequestration // US Patent No 8026058, Sep. 27, 2011.
5. Ashrafi E.H., Paul N. Improved PCR specificity with Hot Start PCR primers // Biotechniques. 2009. V.47. P.789-790.
6. Barnes W.M., Rowlyk K.R. Magnesium precipitate hot start method for PCR // Mol. Cell. Probes. 2002. V.16. P.167-171.
7. Bassam B.J., Caetano-Anolles G. Automated "hot start" PCR using mineral oil and paraffin wax // Biotechniques. 1993. V.14. P.30-34.
8. Birch D.E., Kolmodin L., Wong J., Zangenberg G.A., Zoccoli M.A. Simplified hot start PCR // Nature. 1996. V.381. P.445-446.
9. Birch D.E., Laird W.J., Zoccoli M.A. Nucleic acid amplification using a reversibly inactivated thermostable enzyme // US Patent No 5773258, Jun. 30, 1998.
10. Chou Q., Russell M., Birch D.E., Raymond J., Bloch W. Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications // Nucl. Acids Res. 1992. V.11. P.1717-1723.
11. Colaco C., Sen S., Thangavelu M., Pinder S., Roser B. Extraordinary stability of enzymes dried in trehalose: simplified molecular biology // Biotechnology (NY). 1992. V.10. P.1007-1011.
12. Cooke H. Inexpensive wax for PCR protocols // Trends Genet. 1992. V.8. P.301.
13. Dang C., Jayasena S.D. Oligonucleotide inhibitors of Taq DNA polymerase facilitate detection of low copy number targets by PCR // J. Mol. Biol. 1996. V.264. P.268-278.
14. D'Aquila R.T., Bechtel L.J., Videler J.A., Eron J.J., Gorczyca P., Kaplan J.C. Maximizing sensitivity and specificity of PCR by preamplification heating // Nucl. Acids Res. 1991. V.19. P.3749.
15. Gold L., Jayasena S.D. Nucleic acid ligand inhibitors to DNA polymerases // US Patent No 5763173, Jun. 9, 1998.
16. Faloona F.S., Weiss S., Ferre F., Mullis K. // 1990. 6th Intl. Conf. AIDS. San Francisco, CA, USA (abstract No 1019) цит. по Birch et al., 1996.
17. Hebert B., Bergeron J., Potworowski E.F., Tijssen P. Increased PCR sensitivity by using paraffin wax as a reaction mix overlay // Mol. Cell. Probes. 1993. V.7. P.249-252.
18. Horton R.M., Hoppe B.L., Conti-Tronconi B.M. AmpliGrease: "hot start" PCR using petroleum jelly // Biotechniques. 1994. V.16. P.42-43.
19. Kaboev O.K., Luchkina L.A., Tret'jakov A.N., Bahrmand A.R. PCR hot start using primers with the structure of molecular beacons (hairpin-like structure) // Nucl. Acids Res. 2000. V.28. E94.

20. Kaijalainen S., Karhunen P.J., Lalu K., Lindstrom K. An alternative hot start technique for PCR in small volumes using beads of wax-embedded reaction components dried in trehalose // *Nucl. Acids Res.* 1993. V.21. P.2959-2960.
21. Kainz P., Schmiedlechner A., Strack H.B. Specificity-enhanced hot-start PCR: addition of double-stranded DNA fragments adapted to the annealing temperature // *Biotechniques.* 2000. V.28. P.278-282.
22. Kebelmann-Betzing C., Seeger K., Dragon S., Schmitt G., Moricke A., Schild T.A., Henze G., Beyermann B. Advantages of a new Taq DNA polymerase in multiplex PCR and time-release PCR // *Biotechniques.* 1998. V.24. P.154-158.
23. Kellogg DE, Rybalkin I, Chen S, Mukhamedova N, Vlasik T, Siebert PD, Chenchik A. TaqStart Antibody: "hot start" PCR facilitated by a neutralizing monoclonal antibody directed against Taq DNA polymerase // *Biotechniques.* 1994. V.16. P.1134-1137.
24. Kermekchiev M.B., Tzekov A., Barnes W.M. Cold-sensitive mutants of Taq DNA polymerase provide a hot start for PCR // *Nucl. Acids Res.* 2003. V.31. P.6139-6147.
25. Kong D., Shen H., Huang Y., Mi H. PCR hot-start using duplex primers // *Biotechnol. Lett.* 2004. V.26. P.277-280.
26. Kosak K.M., Kosak M.K. Preparation of wax beads containing a reagent for release by heating // *US Patent No 5413924*, May. 9, 1995.
27. Koukhareva I., Haoqiang H., Yee J., Shum J., Paul N., Hogrefe R.I., Lebedev A.V. Heat activatable 3'-modified dNTPs: synthesis and application for hot start PCR // *Nucl. Acids Symp. Ser. (Oxf).* 2008. V.52. P.259-260.
28. Koukhareva I., Lebedev A. 3'-Protected 2'-deoxynucleoside 5'-triphosphates as a tool for heat-triggered activation of polymerase chain reaction // *Anal. Chem.* 2009. V.81. P.4955-4962.
29. Le T., Ashrafi H.E., Paul N. Enhancing multiplex PCR efficiency using Hot Start dNTPs // *Biotechniques.* 2009. V.47. P.972-973.
30. Le T., Paul N. Improved PCR flexibility with Hot Start dNTPs // *Biotechniques.* 2009. V.47. P.789-790.
31. Lebedev A.V., Paul N., Yee J., Timoshchuk V.A., Shum J., Miyagi K., Kellum J., Hogrefe R.I., Zon G. Hot start PCR with heat-activatable primers: a novel approach for improved PCR performance // *Nucl. Acids Res.* 2008. V.36. e131.
32. Li M., Lin Y.C., Wu C.C., Liu H.S. Enhancing the efficiency of a PCR using gold nanoparticles // *Nucl. Acids Res.* 2005. V.33. e184. Erratum in: *Nucl. Acids Res.* 2006. V.34. P.396.
33. Lin Y., Jayasena S.D. Inhibition of multiple thermostable DNA polymerases by a heterodimeric aptamer // *J. Mol. Biol.* 1997. V.271. P.100-111.
34. Louwrier A. Reversible inactivation enzymes // *US Patent No 6479264*, Nov. 12, 2002.
35. Mi L., Wen Y., Pan D., Wang Y., Fan C., Hu J. Modulation of DNA polymerases with gold nanoparticles and their applications in hot-start PCR // *Small.* 2009. V.5. P.2597-2600.
36. Mi L.J., Zhu H.P., Zhang X.D., Hu J., Fan C.H. Mechanism of the interaction between Au nanoparticles and polymerase in nanoparticle PCR // *Chinese Sci. Bull.* 2007. V.52. P. 2345-2349.
37. Mizuguchi H., Nakatsuji M., Fujiwara S., Takagi M., Imanaka T. Characterization and application to hot start PCR of neutralizing monoclonal antibodies against KOD DNA polymerase // *J. Biochem.* 1999. V.126. P.762-768.
38. Moretti T., Koons B., Budowle B. Enhancement of PCR amplification yield and specificity using AmpliTaq Gold DNA polymerase // *Biotechniques.* 1998. V.25. P.716-722.
39. Mullis K.B. The Polymerase Chain Reaction in an Anemic Mode: How to Avoid Cold Oligodeoxyribonuclear Fusion // *PCR Meth. Appl.* 1991. V.1, P.1-4.
40. Mullis K.B., Faloona F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction // *Methods Enzymol.* 1987. V.155. P.335-350.
41. Nilsson J., Bosnes M., Larsen F., Nygren P.A., Uhlen M., Lundeberg J. Heat-mediated activation of affinity-immobilized Taq DNA polymerase // *Biotechniques.* 1997. V.22. P.744-751.
42. Nuovo G.J., Gallery F., Hom R., MacConnell P., Bloch W. Importance of different variables for enhancing in situ detection of PCR-amplified DNA // *PCR Methods Appl.* 1993. V.2. P.305-312.
43. Sharkey D.J., Scalice E.R., Christy K.G. Jr., Atwood S.M., Daiss J.L. Antibodies as thermolabile switches: high temperature triggering for the polymerase chain reaction // *Biotechnology (NY).* 1994. V.12. P.506-509.
44. Sparkman D.R. Paraffin wax as a vapor barrier for the PCR // *PCR Meth. Appl.* 1992. V.2, P.180-181.
45. Wainwright L.A., Seifert H.S. Paraffin beads can replace mineral oil as an evaporation barrier in PCR // *Biotechniques.* 1993. V.14. P.34-36.
46. Young D.D., Edwards W.F., Lusic H., Lively M.O., Deiters A. Light-triggered polymerase chain reaction // *Chem. Commun.* 2008. P.462-464.
47. Zimmermann K., Mannhalter J.W. Comparable sensitivity and specificity of nested PCR and single-stage PCR using a thermally activated DNA polymerase // *Biotechniques.* 1998. V.24. P.222-224.

HOT START OR TIME-RELEASE PCR

Chemeris D.A., Magdanov E.G., Mashkov O.I., Garafutdinov R.R., Chemeris A.V.

Institute of Biochemistry and Genetics of Ufa Science Centre of Russian Academy of Sciences, Ufa, chemeris@anrb.ru

Resume

“Hot start PCR” was first mentioned for using high temperature at first step of PCR. Later a “Time-release PCR” came to life, emphasizing temporary exclusion of some components from a reaction, which leads to delay in start of amplicon generation and higher specificity of reaction. In this article, these techniques are being observed in chronological order.

Keywords: PCR, hot start PCR, time-release PCR, DNA polymerase, primers, dNTPs, magnesium ions