



# БИОМИКА/BIOMICS

ISSN 2221-6197 <http://biomicsj.ru>



## ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ РЯДА ГЕКСАГИДРОПИРИМИДИНА, БИС(1,2,3,4-ТЕТРАГИДРОПИРИДИНА) И СОЛИ ТЕТРАГИДРОПИРИМИДИНИЯ НА ПРОТЕКАНИЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Хасанова А.А.<sup>1</sup>, Киреева Д.Р.<sup>2</sup>, Гибадуллина Н.Н.<sup>2</sup>,  
Фазлетдинова З.Н.<sup>3</sup>, Сахабутдинова А.Р.<sup>1</sup>, Гарафутдинов Р.Р.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Россия, Республика Башкортостан, 450054 г. Уфа, просп. Октября, 71

<sup>2</sup>Уфимский Институт химии – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Россия, Республика Башкортостан, 450054 г. Уфа, просп. Октября, 69

<sup>3</sup>ФГБОУ ВО Башкирский государственный университет,  
Россия, Республика Башкортостан, 450076 г. Уфа, ул. Заки Валиди, д.32  
e-mail: [garafutdinovr@gmail.com](mailto:garafutdinovr@gmail.com)

### Резюме

Полимеразная цепная реакция является незаменимым методом современной биологической науки и медицины. Метод заключается в ферментативной наработке фрагментов нуклеиновых кислот путем многократного увеличения количества исходной ДНК или РНК мишени. Необходимость анализа с помощью ПЦР сложных биологических материалов обуславливает разработку подходов, повышающих чувствительность и специфичность реакции. Одним из таких приемов является добавление в ПЦР-реакционные смеси специальных веществ - ингибиторов или энхансеров ПЦР, модулирующих протекание реакции. В данной работе исследовано протекание ПЦР в присутствии Na-солей производных гексагидропиримидина и бис(1,2,3,4-тетрагидропиридина) и соли тетрагидропиримидиния - структурных аналогов эктоинов, известных как энхансеры ПЦР. Оказалось, что протестированные производные гексагидропиримидина практически не влияют на протекание ПЦР, а производные бис(1,2,3,4-тетрагидропиридина) в основном полностью ингибируют ПЦР в концентрации 10 мМ. Ближайший аналог эктоина, соль тетрагидропиримидиния, оказывает умеренный ингибирующий эффект.

**Ключевые слова:** нуклеиновые кислоты, полимеразная цепная реакция, ингибиторы ПЦР, энхансеры ПЦР, гексагидропиримидин, тетрагидропиридин

**Цитирование:** Хасанова А.А., Киреева Д.Р., Гибадуллина Н.Н., Фазлетдинова З.Н., Сахабутдинова А.Р., Гарафутдинов Р.Р. Влияние производных ряда гексагидропиримидина, бис(1,2,3,4-тетрагидропиридина) и соли тетрагидропиримидиния на протекание полимеразной цепной реакции // Биомика. 2019.Т.11(1). С. 14 – 22. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2019-03

## THE INFLUENCE OF HEXAHYDROPYRIMIDINE, BIS(1,2,3,4-TETRAHYDROPYRIDINE) DERIVATIVES AND TETRAHYDROPYRIMIDINIUM SALT ON POLYMERASE CHAIN REACTION

Khasanova A.A.<sup>1</sup>, Kireeva D.R.<sup>2</sup>, Gibadullina N.N.<sup>2</sup>, Fazletdinova Z.N.<sup>3</sup>, Sakhabutdinova A.R.<sup>1</sup>, Garafutdinov R.R.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Institute of Biochemistry and Genetics - Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Russia, Bashkortostan, 450054, Ufa, pr. Oktyabrya, 71

<sup>2</sup> Ufa Institute of Chemistry - Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Russia, Bashkortostan, 450054, Ufa, pr. Oktyabrya, 69

<sup>3</sup> Bashkir State University, Russia, Bashkortostan, 450076, Ufa, Zaki Validi st., 32  
e-mail: [garafutdinovr@gmail.com](mailto:garafutdinovr@gmail.com)

### Summary

Polymerase chain reaction is an indispensable method of modern biological science and medicine. This method consists in enzymatic formation of nucleic acid fragments after multiple increasing in the amount of the original DNA or RNA target. The need for PCR analysis of complex biological materials leads to the development of approaches that increase the sensitivity and specificity of the reaction. One of such methods is the addition of special substances to PCR-reaction mixtures - inhibitors or PCR enhancers, which modulate the course of the reaction. In this study, the course of PCR was studied in the presence of Na-salts of hexahydropyrimidine and bis(1,2,3,4-tetrahydropyridine) derivatives and tetrahydropyrimidinium salt - analogues of ectoins that known as PCR enhancers. It turned out that the hexahydropyrimidine derivatives had practically no effect on the course of PCR, and the bis(1,2,3,4-tetrahydropyridine) derivatives mostly inhibited PCR at a concentration of 10 mM. The closest analogue of ectoine, tetrahydropyrimidinium salt, has a moderate inhibitory effect.

**Keywords:** nucleic acids, polymerase chain reaction, PCR inhibitors, PCR enhancers, hexahydropyrimidine, tetrahydropyridine

**Citation:** Khasanova A.A., Kireeva D.R., Gibadullina N.N., Fazletdinova Z.N., Sakhabutdinova A.R., Garafutdinov R.R. The influence of hexahydropyrimidine, bis(1,2,3,4-tetrahydropyridine) derivatives and tetrahydropyrimidinium salt on polymerase chain reaction. *Biomics*. 2019. V.11(1). P.14 – 22. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2019-03

### Введение

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – метод наработки фрагментов нуклеиновых кислот (НК) путем многократного увеличения количества исходной НК-мишени до уровня, обеспечивающего ее уверенное обнаружение инструментальными методами [Mullis, Faloona, 1987; Saiki et al., 1985]. ПЦР является наиболее широко используемым методом для молекулярной диагностики различных заболеваний [Burtis et al., 2013], анализа объектов окружающей среды [Saito et al., 2014] и продуктов питания [Chaouachi et al., 2013], в экспертно-криминалистической деятельности [Brettel et al., 2011]. Практическое применение ПЦР обуславливает поиск способов совершенствования метода и разработки его новых вариантов, так как НК, выделяемые из биологических образцов, нередко являются "сложными" для амплификации из-за наличия фоновой ДНК (например, ДНК из многокомпонентных систем – почвы, природных и сточных вод, медицинского мазка и др.), разрушенности молекул (древняя ДНК или ДНК, разрушенная под воздействием физических и химических факторов), малого количества ДНК и др.

Трудности при анализе НК часто связаны также с наличием в образцах соединений, выделяющихся совместно с НК и ингибирующих ПЦР. Например, при выделении ДНК из биоматериалов человека возможно сосаждение вместе с ДНК солей желчных кислот, мочевины, гема, гепарина, белков и углеводов, а при выделении ДНК из растительных объектов - полисахаридов, алкалоидов, терпенов, танинов, фенольных соединений, образующих с ДНК сложные комплексы. Другими важными источниками ингибиторов ПЦР являются материалы и реагенты, которые контактируют с образцами во время обработки

или очистки ДНК. Превышение определенных концентраций самих реактивов, использованных при выделении (ЦТАБ, ЭДТА, избыток KCl, NaCl и других солей, этанол, изопропанол, фенол, ацетат натрия и т.д.), могут привести к ингибированию амплификации. В ряде обзорных статей показано значительное снижение чувствительности и эффективности ПЦР или получение ложных результатов, вызванное наличием ингибирующих компонентов [Чемерис и др., 2012a; Чемерис и др., 2012b].

Исключение ингибирования ПЦР добиваются в основном повышением качества/чистоты ДНК, для чего используют различные методики выделения, разработанные под конкретные биологические объекты [например, Hofreiter, Shapiro, 2012]. Имеется большое количество коммерческих наборов для быстрой экстракции ДНК, однако они чаще применяются для выделения нуклеиновых кислот из относительно "чистых" источников. Для выделения ДНК из "сложных" образцов (биологические жидкости, продукты питания, почва, останки из захоронений, поверхностные и сточные воды и пр.) нередко прибегают к модификации методик экстракции. Одним из способов снижения влияния ингибиторов является использование максимально сближенных праймеров (праймеры, расположенные встык, т.е. 3'-концы которых располагаются на смежных нуклеотидах комплементарных цепей ДНК-матрицы), для которых ПЦР характеризуется высокими специфичностью и чувствительностью [Garafutdinov et al., 2017; Garafutdinov et al., 2015; Галимова и др., 2017].

Одним из подходов к повышению эффективности ПЦР стало использование специальных веществ - энхансеров ПЦР, улучшающих специфичность и эффективность реакции, а также выход целевого продукта амплификации. Впервые об энхансерах ПЦР

упоминается в работе [Bookstein et al., 1990], где авторы для получения специфичного продукта добавляли в ПЦР смесь 10% ДМСО. Показано также, что наряду с ДМСО для преодоления ингибирующего действия некоторых растительных полисахаридов могут быть эффективно применены 0,25% или 0,5% Tween 20 и 5% полиэтиленгликоль 400 [Demeke, Adams, 1992]. Позднее для повышения эффективности ПЦР были предложены соли тетраалкиламмония [Chevet et al., 1995], амиды [Sarkar et al., 1990; Kovárová, Dráber, 2000; Chakrabarti, Schutt, 2001a], сульфоксидов [Chakrabarti, Schutt, 2002], сульфонов [Chakrabarti, Schutt, 2001b], бетаина [Baskaran et al., 1996; Hengen, 1997; Henke et al., 1997; Frackman et al., 1998], трегалозы [Spiess et al., 2004], многоатомные спирты [Zhang et al., 2009; Nagai et al., 1998; Demeke, Adams, 1992], белки [Nagai et al., 1998; Kreader, 1996], неионные детергенты [Bachmann et al., 1990; Demeke, Adams, 1992; Liu, 1995], нуклеотидные аналоги [McConlogue et al., 1988; Turner, Jenkins, 1995], золотые и серебряные наночастицы [Chen, 2012; Kambli, 2016].

Интересными агентами повышения эффективности ПЦР являются эктоины - органические соединения цвиттер-ионной природы, содержащие азотистые гетероциклы. Было показано влияние ряда эктоинов на протекание ПЦР [Schnoog, 2004], при этом оказалось, что характер влияния (ингибирование или повышение эффективности амплификации) зависит от структуры соединения. В данной работе было изучено протекание полимеразной цепной реакции в присутствии аналогов эктоинов - производных гексагидропиримидина, бис(1,2,3,4-тетрагидропиридина) и соли тетрагидропиримидиния (VIII).

#### Экспериментальная часть

В работе были использованы следующие реактивы: 5-(этиллио)-1*H*-тетразол, амидофосфиты (dA-CE, dC-CE, dG-CE, dT-CE), носители для синтеза олигонуклеотидов (dA-CPG, dC-CPG, dG-CPG, dT-CPG) (все Glen Research); абсолютные ацетонитрил и тетрагидрофуран квалификации «для синтеза ДНК» (Panreac); акриламид, *N,N'*-метиленбисакриламид, ТРИС, персульфат аммония, динатриевая соль *N,N,N',N'*-этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), *N,N,N',N'*-тетраметилэтилендиамин, додецилсульфат натрия (ДДС) (все AppliChem); Taq полимеразы (Fermentas), дезоксинуклеозидтрифосфаты (дНТФ) (СибЭнзим), SYBR Green I (Биотех-Индустрия). Для приготовления всех растворов использовали воду высшей категории качества (>18МОм) (Millipore).

Производные гексагидропиримидина, бис(1,2,3,4-тетрагидропиридина) I - VII и соль тетрагидропиримидиния (VIII) получали по методикам, описанным в [Latypova et al., 2017; Gibadullina et al., 2017; Гибадуллина и др., 2017; Ишмияров Э.Р. и др. 2015; Gibadullina et al., 2018]. В данной работе для соединений I-VI использовали их натриевые соли, которые получали омылением сложных эфиров в смеси ДМСО и 10%-ного

водного NaOH (1:1 об.) при 95°C в течение 5-12 ч. Для соединения VII также получали соль взаимодействием с эквимолярным количеством уксусной кислоты, а соединение VIII использовали без дополнительных химических превращений. До добавления указанных веществ в ПЦР смеси готовили их 100 мМ растворы в 30%-ном водном ДМСО, из которого готовили соответствующие разведения, при этом содержание ДМСО в стоковых растворах сохраняли постоянным.

В качестве ДНК-матрицы для ПЦР использовали ДНК богомола обыкновенного (*Mantis religiosa*), которую выделяли из мышечной ткани насекомого с помощью коммерческого набора ДНК-Экстран-2 (Синтол) строго по протоколу производителя. Для амплификации брали прямой MR F (5'-ТТААГГАТСТТТСТГСАТСТС-3') и обратный MR R (5'-СТГТСТГСАТСТТСТТСТ-3') праймеры, которые подбирали с использованием online-утилиты OligoAnalyzer (Integrated DNA Technologies) к гену 28S рРНК на основе нуклеотидной последовательности, депонированной в GenBank. Синтез праймеров осуществлен на автоматическом ДНК-синтезаторе ASM-800 (Биоссет) амидофосфитным способом, их очистку проводили методом гель-электрофореза в 15%-ном полиакриламидном геле. Концентрацию всех нуклеиновых кислот определяли по оптической плотности водного раствора при 260 нм на спектрофотометре BioSpec-Mini (Shimadzu).

Полимеразную цепную реакцию проводили в реальном времени в ДНК-амплификаторе iQ5 (Bio-Rad Laboratories). Реакционные смеси объемом 10 мкл содержали 3 нг ДНК богомола, 0,5 мкл каждого из праймеров с концентрацией 1,0 О.Е./мл, 2,5 ед. акт. Taq полимеразы, 1,0 мкл смеси dNTP с концентрацией 2,5 мМ, 1 мкл буфера для Taq полимеразы (67 мМ Трис-НСl (рН 8,8), 2,0 мМ MgCl<sub>2</sub>, 18 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,01% Твин-20), 1 мкл 10-кратного раствора SYBR Green I и 1 мкл раствора одного из производных I-VIII. Каждый образец был представлен в трех повторах. Использовали программу, рекомендуемую для ПЦР в режиме реального времени с применением интеркалирующих красителей: начальная денатурация при 94°C (3 мин), 70 циклов - денатурация при 94°C (15 с), отжиг при 60°C (40 с), элонгация при 72°C (30 с), конечная элонгация при 72°C (2 мин).

#### Результаты и обсуждение

Характер влияния того или иного соединения на протекание полимеразной цепной реакции (ее ингибирование или повышение эффективности амплификации) зависит от структуры вещества. В связи с необходимостью повышения чувствительности и специфичности ПЦР продолжается поиск так называемых энхансеров ПЦР, способствующих повышению эффективности данной реакции.

Влияние гексагидропиримидинов и тетрагидропиридинов на ПДР

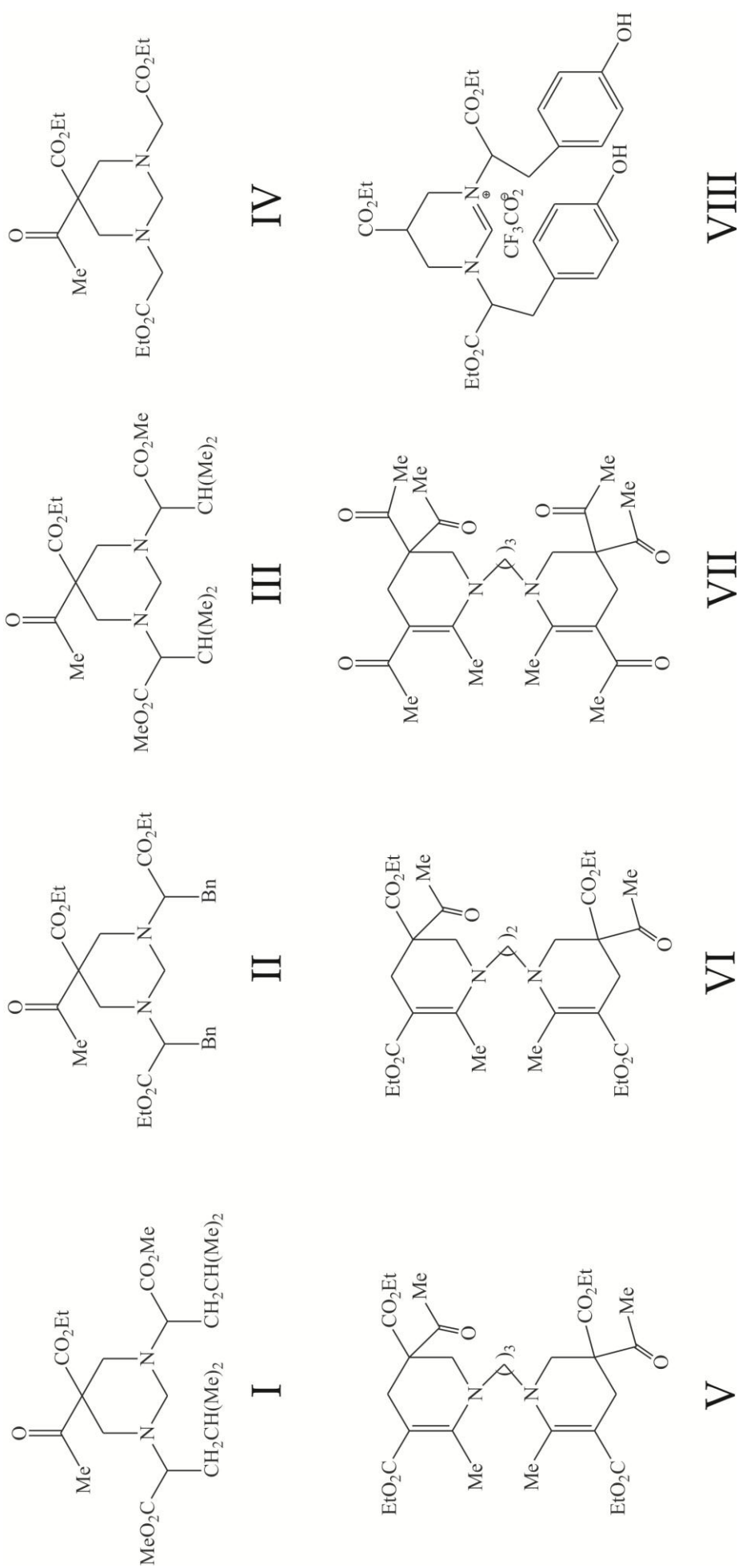


Рис. 1. Структуры использованных в работе производных гексагидропиримидина (I-IV), бис(1,2,3,4-тетрагидропиридина) (V-VII) и соли тетрагидропиримидиния (VIII).

В настоящей работе было изучено влияние ряда производных гексагидропиримидина, бис(1,2,3,4-тетрагидропиримидина) I - VII и соли тетрагидропиримидиния (VIII) - аналогов эктоинов, известных в качестве энхансеров ПЦР. Структуры взятых соединений приведены на рисунке 1. Соединения I - IV являются производными гексагидропиримидина, соединения V - VII - производными бис(1,2,3,4-тетрагидропиримидина), а соль тетрагидропиримидиния VIII содержит характерное для эктоинов гетероциклическое ядро с четвертичным атомом азота. Влияние солевых форм указанных веществ на протекание амплификации оценивали путем проведения ПЦР в режиме реального времени. Амплификации подвергали фрагмент высококопийного гена 28S рРНК богомола обыкновенного с использованием пары праймеров с традиционным расположением. В эксперименты были взяты для всех веществ четыре концентрационные точки: 10, 1, 0.1 и 0.01 мМ (в конечном растворе). Поскольку вещества умеренно растворимы в воде, использовали их растворы в разбавленном водном ДМСО, конечная концентрация которого в ПЦР-образцах составляла 3% (об.), что недостаточно для

влияния непосредственно самого ДМСО на протекание ПЦР.

В качестве параметров, характеризующих влияние протестированных веществ, были использованы пороговый цикл Ct и относительная интенсивность флуоресценции RFU. Значения пороговых циклов Ct соответствуют началу экспоненциальной фазы накопления ампликонов и прямо коррелируют со скоростью реакции. При прочих равных условиях величина Ct обратно пропорциональна логарифму начальной концентрации ДНК-матриц, однако при наличии ингибиторов ПЦР значения Ct смещаются в сторону больших величин. Чем сильнее влияние ингибитора, тем больше значение порогового цикла. Значение интенсивности флуоресценции RFU определяется по завершению экспоненциальной фазы реакции. Оно коррелирует с количеством двуцепочечных продуктов и, соответственно, с эффективностью амплификации: чем выше значение RFU, тем большее количество продуктов образовалось. Полученные в результате проведенных экспериментов значения Ct и RFU приведены в таблице 1.

Таблица 1.

Характеристики кривых амплификации: Ct - значение порогового цикла, RFU - относительная интенсивность флуоресценции после выхода кривых на плато.

Соединение	Параметр	Концентрация соединения (мМ)				
		10	1	0.1	0.01	0
I	Ct	17.4±0.4	17.6±0.3	17.0±0.4	17.5±0.3	17.2±0.4
	RFU	525±40	550±20	550±35	600±80	570±40
II	Ct	18.2±0.3	16.8±0.2	16.9±0.2	17.1±0.4	16.8±0.5
	RFU	580±30	620±50	600±25	620±20	600±25
III	Ct	17.5±0.3	17.0±0.4	17.2±0.3	16.9±0.3	16.7±0.4
	RFU	690±40	710±45	650±30	670±35	700±30
IV	Ct	F*	F	17.0±0.2	16.4±0.3	16.4±0.2
	RFU	F	F	710±45	790±30	830±30
V	Ct	N/A**	16.9±0.6	16.6±0.3	16.8±0.4	16.3±0.3
	RFU	N/A	450±30	590±45	670±30	730±20
VI	Ct	N/A	16.6±0.3	16.6±0.2	16.2±0.4	16.8±0.5
	RFU	N/A	520±20	520±25	620±30	600±20
VII	Ct	20.2±0.2	17.6±0.3	16.8±0.5	16.7±0.4	16.4±0.3
	RFU	450±35	430±30	510±30	615±40	720±10
VIII	Ct	N/A	17.3±0.3	17.5±0.4	17.3±0.4	17.6±0.3
	RFU	N/A	250±30	680±35	800±30	810±20

\* F - исследованное соединение флуоресцирует и маскирует результат амплификации.

\*\* N/A - подъема кривых не наблюдалось.

Полученные значения Ct и RFU показывают, что ни одно из проанализированных соединений не выступает в качестве энхансера ПЦР. Наоборот, они либо практически не влияют на протекание ПЦР (соединения I - III), либо оказывают ингибирующий

эффект. При этом ингибирующий эффект проявляется двояко (рис. 2): либо только путем снижения интенсивности флуоресценции (для соединений V и VIII), либо преимущественно путем увеличения порогового цикла (для соединения VII).

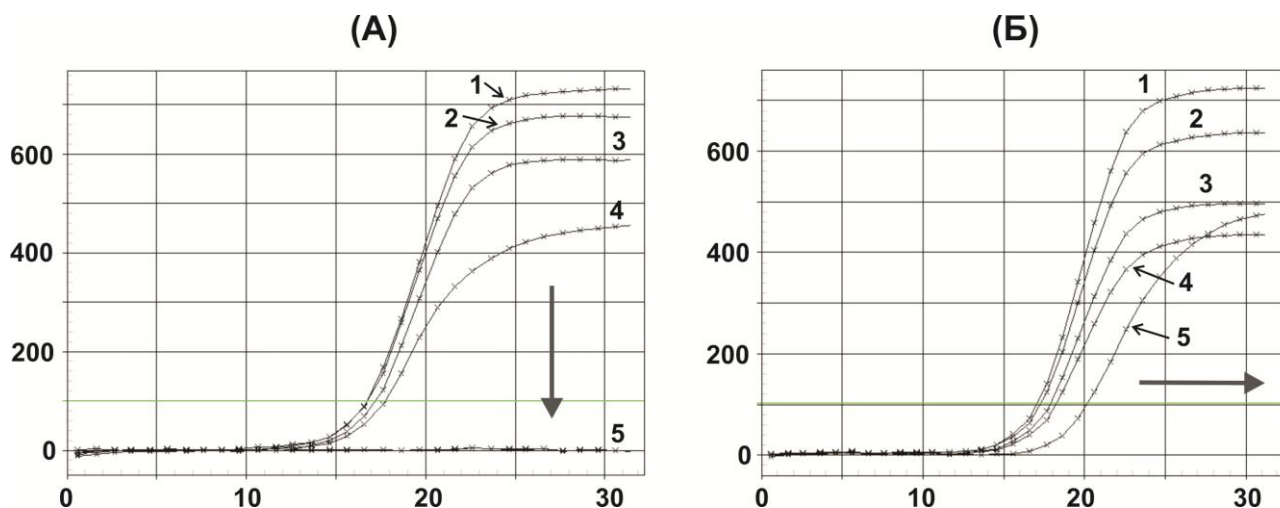


Рис. 2. Характер изменения кривых амплификации: (А) - ингибирование, приводящее к снижению интенсивности флуоресценции RFU (соединение V: кривые 1 - 0 мМ, 2 - 0.01 мМ, 3 - 0.1 мМ, 4 - 1 мМ, 5 - 10 мМ), (Б) - ингибирование, приводящее к увеличению величины порогового цикла  $C_t$  (соединение VII: кривые 1 - 0 мМ, 2 - 0.01 мМ, 3 - 0.1 мМ, 4 - 1 мМ, 5 - 10 мМ)

Соединения V, VI и VIII в максимальной из взятых концентраций (10 мМ) полностью ингибируют ПЦР. Оказалось неожиданным, что соединение IV флуоресцирует в области детекции использованного красителя SYBR Green I (канал 520 нм), что сделало невозможным оценку влияния двух максимальных концентраций данного вещества на протекание ПЦР. Таким образом, протестированные производные гексагидропиримидина (структуры I - IV) практически не влияют на протекание ПЦР. Некоторые производные бис(1,2,3,4-тетрагидропиримидина) (структуры V и VI) полностью ингибируют ПЦР в концентрации 10 мМ. Умеренный ингибирующий эффект оказывает аналог эктоина - соль тетрагидропиримидиния VIII.

Работа выполнена в рамках темы № АААА-А16-116020350032-1 государственного задания ИБГ УФИЦ РАН на оборудовании ЦКП «Биомика» и УНУ «КОДИНК». Синтез исследованных соединений осуществлен по теме № АААА-А17-1170011910021-8 государственного задания УФИХ УФИЦ РАН.

### Литература

Галимова А.А., Сахабутдинова А.Р., Гарафутдинов Р.Р. Протекание полимеразной цепной реакции с праймерами «встык» в присутствии ингибиторов // Вестник Башгосуниверситета. 2017. Т. 22. С. 1017-1021.

Гибадуллина Н.Н., Латыпова Д.Р., Нугуманов Т.Р., Спирихин Л.В., Докичев В.А. Синтез полифункционализированных 1,1'-( $\alpha,\omega$ -алкандиил)бис(1,2,3,4-тетрагидропиримидинов) // Химия гетероцикл. соед. 2017. Т. 53. С. 1098-1102.

Ишмияров Э.Р., Рахимова Н.Т., Латыпова Д.Р., Спирихин Л.В., Абдуллин М.И., Докичев В.А. Однореакторный синтез ползамещенных 1,2,3,4-тетрагидропиримидинов // Журн. орган. хим. 2015. Т. 51. Вып. 12. С. 1770-1773.

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. С. 31-47.

Чемерис А.В., Магданов Э.Г., Гарафутдинов Р.Р., Вахитов В.А. Как исключить появление ложнопозитивных результатов при проведении полимеразной цепной реакции // Вестник биотехнол. физ.-хим. биол. 2012. Т. 8. № 3. с. 34-45.

Bachmann B., Luke W., Hunsmann G. Improvement of PCR amplified DNA sequencing with the aid of detergents // Nucleic Acids Res. 1990. V. 18. P. 1309. doi: 10.1093/nar/18.5.1309

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. doi: 10.1101/gr.6.7.633

Bookstein R. Lai C.C., To H., Lee W.H. PCR-based detection of a polymorphic BamHI site in intron 1 of the human retinoblastoma (RB) gene // Nucleic Acids Res. 1990. V. 18. P. 1666. doi: 10.1093/nar/18.6.1666

Brettell T.A., Butler J.M., Almirall J.R. Forensic science // Anal. Chem. 2011. V. 83. P. 4539-4556. doi: 10.1021/ac201075e

Burtis C.A., Ashwood E.R., Bruns D.E. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. 6th ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2017.

Chakrabarti R., Schutt C.E. The enhancement of PCR amplification by low molecular weight amides // Nucleic Acids Res. 2001a. V. 29. P. 2377-2381. doi: 10.1093/nar/29.11.2377

Chakrabarti R., Schutt C.E. Novel sulfoxides facilitate GC-rich template amplification // Biotechniques. 2002. V. 32. P. 866-874. DOI: 10.2144/02324rr04

Chakrabarti R., Schutt C.E. The enhancement of PCR amplification by low molecular-weight sulfones // Gene. 2001b. V. 274. P. 293-298. doi: 10.1016/S0378-1119(01)00621-7

Chaouachi M., Bérard A., Saïd K. Relative quantification in seed GMO analysis: state of art and bottle-necks // Transgenic Res. 2013. V. 22. P. 461-476. doi: 10.1007/s11248-012-9684-1

- Chen J., Cao X., Guo R., Shen M., Peng C., Xiao T., Shi X. A highly effective polymerase chain reaction enhancer based on dendrimer-entrapped gold nanoparticles // *Analyst*. 2012. V. 137. P. 223-228. doi: 10.1039/c1an15816c
- 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. doi: 10.1093/nar/23.16.3343
- Demeke T., Adams R.P. The effects of plant polysaccharides and buffer additives on PCR // *Biotechniques*. 1992. V. 12. P. 332-334.
- Frackman S., Kobs G., Simpson D., Storts D. Betaine and DMSO: enhancing agents for PCR / *Promega Notes*. 1998. V. 65. P. 27.
- Garafutdinov R.R., Galimova A.A., Sakhabutdinova A.R., Vakhitov V.A., Chemeris A.V. DNA Amplification Using PCR with Abutting Primers // *Mol. Biol.* 2015. V. 49. P. 560-568. doi: 10.7868/S0026898415040059
- Garafutdinov R.R., Galimova A.A., Sakhabutdinova A.R. Polymerase chain reaction with nearby primers // *Anal. Biochem.* 2017. V. 518. P. 126-133. doi: 10.1016/j.ab.2016.11.017
- Gibadullina N.N., Latypova D.R., Novikov R.A., Dokichev V.A. Reaction of trifluoromethyl 1,3-dicarbonyl compounds with formaldehyde and esters of natural  $\alpha$ -aminoacids // *Arkivoc*. 2017. iv. P. 222-235. doi: 10.3998/ark.5550190.p010.003
- Gibadullina N.N., Latypova D.R., Vakhitov V.A., Khasanova D.V., Zainullina L.F., Vakhitova Y.V., Lobov A.N., Ugrak B.I., Tomilov Y.V., Dokichev V.A. Synthesis and cytotoxic activities of difluoroacetyl-substituted hexahydropyrimidine derivatives // *J. Fluor. Chem.* 2018. V. 211. P. 94-99. doi: 10.1016/j.jfluchem.2018.04.011
- Hengen P.N. Optimizing multiplex and LA-PCR with betaine // *Trends in Biochem. Sci.* 1997. V. 22. P. 225-226. doi: 10.1016/S0968-0004(97)01069-4
- 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. doi: 10.1093/nar/25.19.3957
- Hofreiter M., Shapiro B. *Ancient DNA: Methods and Protocols* // Humana Press Incorporated. 2012. doi: 10.1007/978-1-61779-516-9
- Kambli P., Kelkar-Mane V. Nanosized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> an efficient PCR yield enhancer - Comparative study with Au, Ag nanoparticles // *Coll. Surf. B: Biointerfaces*. 2016. V. 141. P. 546-552. doi: 10.1016/j.colsurfb.2016.02.024.
- Kovářová M., Dráber P. New specificity and yield enhancer of polymerase chain reactions // *Nucleic Acids Res.* 2000. V. 28. E70. doi: 10.1093/nar/28.13.e70
- Kreider 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.
- Latypova D.R. et al. Synthesis and in vitro cytotoxicity evaluation of some N-substituted  $\alpha$ -amino acid derivatives containing a hexahydropyrimidine moiety // *Med. Chem. Res.* 2017. V. 26. P. 900-908. doi: 10.1007/s00044-017-1802-4.
- Liu Y.S., Thomas R.J., Phillips W.A. Single-step direct PCR amplification from solid tissues // *Nucleic Acids Res.* 1995. V. 23. P. 1640. doi: 10.1093/nar/23.9.1640
- McConlogue L., Brow M.A., Innis M.A. Structure-independent DNA amplification by PCR using 7-deaza-2'-deoxyguanosine // *Nucleic Acids Res.* 1988. V. 16. P. 9869. doi: 10.1093/nar/16.20.9869
- 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. doi: 10.1016/0076-6879(87)55023-6
- Nagai M., Yoshida A., Sato N. Additive effects of bovine serum albumin, dithiothreitol, and glycerol on PCR // *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1998. V. 44. P. 157-163.
- 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
- Saito M., Miyahara S., Villanueva S.Y., Aramaki N., Ikejiri M., Kobayashi Y., Guevarra J.P., Masuzawa T., Gloriani N.G., Yanagihara Y., Yoshida S. PCR and culture identification of pathogenic *Leptospira* sP. from coastal soil in Leyte, Philippines, after a storm surge during Super Typhoon Haiyan (Yolanda) // *Appl. Environ. Microbiol.* 2014. V. 80. P. 6926-6932. doi: 10.1128/AEM.02568-14
- Sarkar G., Kapelner S., Sommer S.S. Formamide can dramatically improve the specificity of PCR // *Nucleic Acids Res.* 1990. V. 18. P. 7465. doi: 10.1093/nar/18.24.7465
- Schnoor M., Voß P., Cullena P., Boking T., Galla H-J., Galinski E.D., Lorkowski S. Characterization of the synthetic compatible solute homoectoine as a potent PCR enhancer // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2004. V. 322. P. 867-872. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.07.200
- Spiess A.N., Mueller N., Ivell R. Trehalose is a potent PCR enhancer: lowering of DNA melting temperature and thermal stabilization of taq polymerase by the disaccharide trehalose // *Clin. Chem.* 2004. V. 50. P. 1256-1259. doi: 10.1373/clinchem.2004.031336.
- Turner S.L., Jenkins F.J. Use of deoxyinosine in PCR to improve amplification of GC-rich DNA // *Biotechniques*. 1995. V. 19. P. 48-52.
- Zhang Z., Yang X., Meng L., Liu F., Shen C., Yang W. Enhanced amplification of GC-rich DNA with two organic reagents // *Biotechniques*. 2009. V. 47. P. 775-779. doi: 10.2144/000113203

## References

- Bachmann B., Luke W., Hunsmann G. Improvement of PCR amplified DNA sequencing with the aid of detergents // *Nucleic Acids Res.* 1990. V. 18. P. 1309. doi: 10.1093/nar/18.5.1309
- 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. doi: 10.1101/gr.6.7.633
- Bookstein R. Lai C.C., To H., Lee W.H. PCR-based detection of a polymorphic BamHI site in intron 1 of the



- human retinoblastoma (RB) gene // *Nucleic Acids Res.* 1990. V. 18. P. 1666. doi: 10.1093/nar/18.6.1666
- Brettell T.A., Butler J.M., Almirall J.R. Forensic science // *Anal. Chem.* 2011. V. 83. P. 4539-4556. doi: 10.1021/ac201075e
- Burtis C.A., Ashwood E.R., Bruns D.E. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. 6th ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2017.
- Chakrabarti R., Schutt C.E. The enhancement of PCR amplification by low molecular weight amides // *Nucleic Acids Res.* 2001a. V. 29. P. 2377-2381. doi: 10.1093/nar/29.11.2377
- Chakrabarti R., Schutt C.E. Novel sulfoxides facilitate GC-rich template amplification // *Biotechniques*. 2002. V. 32. P. 866-874. DOI: 10.2144/02324rr04
- Chakrabarti R., Schutt C.E. The enhancement of PCR amplification by low molecular-weight sulfones // *Gene*. 2001b. V. 274. P. 293-298. doi: 10.1016/S0378-1119(01)00621-7
- Chaouachi M., Bérard A., Saïd K. Relative quantification in seed GMO analysis: state of art and bottle-necks // *Transgenic Res.* 2013. V. 22. P. 461-476. doi: 10.1007/s11248-012-9684-1
- Chemeris A.V., Magdanov E.G., Garafutdinov R.R., Vakhitov V.A. How to eliminate the appearance of false-positive results during the polymerase chain reaction // *Bull. Biotechnol. Phys.-Chem. Biol.* 2012. V. 8. No. 3. P. 34-45.
- Chemeris A.V., Chemeris D.A., Magdanov E.G., Garafutdinov R.R., Nagaev N.R., Vakhitov V.A. The causes of false-negative PCR and prevention some of them // *Biomics*. 2012. V. 4. P. 31-47.
- Chen J., Cao X., Guo R., Shen M., Peng C., Xiao T., Shi X. A highly effective polymerase chain reaction enhancer based on dendrimer-entrapped gold nanoparticles // *Analyst*. 2012. V. 137. P. 223-228. doi: 10.1039/c1an15816c
- 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. doi: 10.1093/nar/23.16.3343
- Demeke T., Adams R.P. The effects of plant polysaccharides and buffer additives on PCR // *Biotechniques*. 1992. V. 12. P. 332-334.
- Frackman S., Kobs G., Simpson D., Storts D. Betaine and DMSO: enhancing agents for PCR / *Promega Notes*. 1998. V. 65. P. 27.
- Galimova A.A., Sakhabutdinova A.R., Garafutdinov R.R. Polymerase chain reaction with abutting primers in the presence of inhibitors // 2017. V. 22. P. 1017-1021.
- Garafutdinov R.R., Galimova A.A., Sakhabutdinova A.R., Vakhitov V.A., Chemeris A.V. DNA Amplification Using PCR with Abutting Primers // *Mol. Biol.* 2015. V. 49. P. 560-568. doi: 10.7868/S0026898415040059
- Garafutdinov R.R., Galimova A.A., Sakhabutdinova A.R. Polymerase chain reaction with nearby primers // *Anal. Biochem.* 2017. V. 518. P. 126-133. doi: 10.1016/j.ab.2016.11.017
- Gibadullina N.N., Latypova D.R., Novikov R.A., Dokichev V.A. Reaction of trifluoromethyl 1,3-dicarbonyl compounds with formaldehyde and esters of natural  $\alpha$ -aminoacids // *Arkivoc*. 2017. iv. P. 222-235. doi: 10.3998/ark.5550190.p010.003
- Gibadullina N.N., Latypova D.R., Vakhitov V.A., Khasanova D.V., Zainullina L.F., Vakhitova Y.V., Lobov A.N., Ugrak B.I., Tomilov Y.V., Dokichev V.A. Synthesis and cytotoxic activities of difluoroacetyl-substituted hexahydropyrimidine derivatives // *J. Fluor. Chem.* 2018. V. 211. P. 94-99. doi: 10.1016/j.jfluchem.2018.04.011
- Gibadullina N.N., Latypova D.R., Nugumanov T.R., Spirikhin L.V., Dokichev V.A. Synthesis of polyfunctionalized 1,1'-( $\alpha$ ,  $\omega$ -alkanediyl)-bis-(1,2,3,4-tetrahydropyridines) // *Chem. Heterocycl. Comp.* 2017. V. 53. P. 1098-1102.
- Hengen P.N. Optimizing multiplex and LA-PCR with betaine // *Trends in Biochem. Sci.* 1997. V. 22. P. 225-226. doi: 10.1016/S0968-0004(97)01069-4
- 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. doi: 10.1093/nar/25.19.3957
- Hofreiter M., Shapiro B. *Ancient DNA: Methods and Protocols* // Humana Press Incorporated. 2012. doi: 10.1007/978-1-61779-516-9
- Ishmiyarov E.R., Rakhimova N.T., Latypova D.R., Spirikhin L.V., Abdullin M.I., Dokichev V.A. One-pot synthesis of polysubstituted 1,2,3,4-tetrahydropyridines // *Rus. J. Org. Chem.* 2015. V. 51. No. 12. P. 1770-1773.
- Kambli P., Kelkar-Mane V. Nanosized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> an efficient PCR yield enhancer - Comparative study with Au, Ag nanoparticles // *Coll. Surf. B: Biointerfaces*. 2016. V. 141. P. 546-552. doi: 10.1016/j.colsurfb.2016.02.024.
- Kovárová M., Dráber P. New specificity and yield enhancer of polymerase chain reactions // *Nucleic Acids Res.* 2000. V. 28. E70. doi: 10.1093/nar/28.13.e70
- 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.
- Latypova D.R. et al. Synthesis and in vitro cytotoxicity evaluation of some N-substituted  $\alpha$ -amino acid derivatives containing a hexahydropyrimidine moiety // *Med. Chem. Res.* 2017. V. 26. P. 900-908. doi: 10.1007/s00044-017-1802-4.
- Liu Y.S., Thomas R.J., Phillips W.A. Single-step direct PCR amplification from solid tissues // *Nucleic Acids Res.* 1995. V. 23. P. 1640. doi: 10.1093/nar/23.9.1640
- McConlogue L., Brow M.A., Innis M.A. Structure-independent DNA amplification by PCR using 7-deaza-2'-deoxyguanosine // *Nucleic Acids Res.* 1988. V. 16. P. 9869. doi: 10.1093/nar/16.20.9869
- 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. doi: 10.1016/0076-6879(87)55023-6
- Nagai M., Yoshida A., Sato N. Additive effects of bovine serum albumin, dithiothreitol, and glycerol on PCR // *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1998. V. 44. P. 157-163.
- 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



- Saito M., Miyahara S., Villanueva S.Y., Aramaki N., Ikejiri M., Kobayashi Y., Guevarra J.P., Masuzawa T., Gloriani N.G., Yanagihara Y., Yoshida S. PCR and culture identification of pathogenic *Leptospira* sP. from coastal soil in Leyte, Philippines, after a storm surge during Super Typhoon Haiyan (Yolanda) // Appl. Environ. Microbiol. 2014. V. 80. P. 6926-6932. doi: 10.1128/AEM.02568-14
- Sarkar G., Kapelner S., Sommer S.S. Formamide can dramatically improve the specificity of PCR // Nucleic Acids Res. 1990. V. 18. P. 7465. doi: 10.1093/nar/18.24.7465
- Schnoor M., Voß P., Cullena P., Boking T., Galla H-J., Galinski E.D., Lorkowski S. Characterization of the synthetic compatible solute homoectoine as a potent PCR enhancer // Biochem. Biophys. Res. Comm. 2004. V. 322. P. 867-872. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.07.200
- Spiess A.N., Mueller N., Ivell R. Trehalose is a potent PCR enhancer: lowering of DNA melting temperature and thermal stabilization of taq polymerase by the disaccharide trehalose // Clin. Chem. 2004. V. 50. P. 1256-1259. doi: 10.1373/clinchem.2004.031336.
- Turner S.L., Jenkins F.J. Use of deoxyinosine in PCR to improve amplification of GC-rich DNA // Biotechniques. 1995. V. 19. P. 48-52.
- Zhang Z., Yang X., Meng L., Liu F., Shen C., Yang W. Enhanced amplification of GC-rich DNA with two organic reagents // Biotechniques. 2009. V. 47. P. 775-779. doi: 10.2144/000113203