



РАЗНООБРАЗИЕ МЕТОДОВ ДЕТЕКЦИИ ПОЛИМОРФНЫХ НУКЛЕОТИДОВ В ИЗВЕСТНЫХ СНИПАХ. I. ТЕРМИНЫ И КРАТКИЙ ПЕРЕЧЕНЬ ПОДХОДОВ

¹Гарафутдинов Р.Р., ²Чемерис Д.А., ¹Сахабутдинова А.Р., ¹Кулуев Б.Р., ¹Чемерис А.В.

¹Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Россия, 450054, Уфа, пр. Октября, 71, garafutdinovr@mail.ru

²ООО «Максим Медикал», Россия, 123423, Москва, ул. Народного Ополчения, д. 34, стр. 1

Резюме

Важность выявления однонуклеотидных замен в геномах разных организмов трудно переоценить, поскольку именно они во многом отвечают за жизненный статус и все шире используются в маркер-ориентированной селекции сельскохозяйственных животных и растений. Если *de novo* обнаружение полиморфных нуклеотидов осуществляется с помощью секвенирования отдельных генов или полных геномов, то детекция уже известных полиморфных нуклеотидов (генотипирование) проводится с помощью огромного количества методов с их бесчисленными вариациями. В данном обзоре дано краткое перечисление основных методов детекции полиморфных нуклеотидов и приведена небольшая историческая справка по терминологии однонуклеотидного полиморфизма, известного сейчас как ОНП или SNP, читаемого как «снип».

Ключевые слова: ДНК, однонуклеотидный полиморфизм, ОНП, снип

Цитирование: Гарафутдинов Р.Р., Чемерис Д.А., Сахабутдинова А.Р., Кулуев Б.Р., Чемерис А.В. Разнообразие методов детекции полиморфных нуклеотидов в известных снипах. I. Термины и краткий перечень подходов // Биомика. 2021. Т.13(4). С.434-443. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2021-30

© Авторы

THE DIVERSITY OF METHODS FOR THE DETECTION OF POLYMORPHIC NUCLEOTIDES IN THE KNOWN SNPs. I. TERMS AND BRIEF LIST OF APPROACHES

¹Garafutdinov R.R., ²Chemiris D.A., ¹Sakhabutdinova A.R., ¹Kuluev B.R., ¹Chemiris A.V.

¹Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, Russia, Ufa, 450054, 71 Pr. Oktyabrya, E-mail: garafutdinovr@gmail.com

²Maxim Medical LLC, 34-1 Narodnogo Opolcheniya str., Moscow, 123423, Russia

Resume

The importance of detection of single-nucleotide substitutions in the genomes of different organisms can hardly be overestimated, since they are largely responsible for the vital status and increasingly used in marker-assisted breeding of agricultural animals and plants. If the *de novo* detection of polymorphic nucleotides is carried out by sequencing either separate genes or complete genomes, then the detection of polymorphic nucleotides that have already become known (genotyping) is carried out by a huge number of methods and their countless variations. This review provides a brief enumeration of the main methods for detecting polymorphic nucleotides and provides a small historical reference on the terminology of single-nucleotide polymorphism, now known as SNP, read as "snip".

Keywords: DNA, single-nucleotide polymorphism, SNP

Citation: Garafutdinov R.R., Chemiris D.A., Sakhabutdinova A.R., Kuluev B.R., Chemiris A.V. The diversity of methods for the detection of polymorphic nucleotides in the known SNPs. I. Terms and brief list of approaches. *Biomics*. 2021. V.13(4). P.434-443. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2021-30 (In Russian)

© Authors

Введение

Данная статья предваряет цикл публикаций, посвященных методам детекции однонуклеотидного полиморфизма (генотипированию), в которых мы намерены рассмотреть всевозможные подходы и способы обнаружения полиморфных нуклеотидов. При этом, как это ни странно, обзорных статей по методам детекции уже известных замен нуклеотидов или мутаций не так много, и датируются они довольно далекими годами [Parsons, Heflich, 1997; Kwok, 2001; Kwok, Chen, 2003; Kim, Misra, 2007; Ding, Jin, 2009]. Это объясняется огромным разнообразием используемых подходов, которые в один, даже самый большой обзор не уместить. В действительности, имеется целый ряд более современных обзоров, в которых рассматриваются узкоспециализированные подходы, но они будут упоминаться нами при описании соответствующих методов генотипирования в сопровождающих статьях. В российском интернете есть довольно полный обзор различных методов детекции SNP, подготовленный Т.Бородиной (http://chegdomyn.narod.ru/pmb/review/04_03.html), но ему также уже около двух десятилетий, и некоторые подходы изложены в нем весьма кратко. В этой связи, учитывая постоянно растущий интерес к этой области молекулярной генетики, в том числе при проведении репликативных исследований, крайне необходимо заполнить данный пробел, тем более что в мире наблюдается бум вокруг совершенствования старых и разработки все новых методов детекции уже известных однонуклеотидных замен. Причин тому немало. Помимо того, что некоторые такие замены ответственны за наследственные заболевания, за предрасположенность к патологии, они еще способны влиять на эффективность терапии с использованием некоторых лекарственных препаратов. Фенотипическое проявление генетических особенностей организмов, включая человека, также зависит во многом от однонуклеотидных замен, что находит в последние годы применение в ДНК-криминалистике для поиска преступников [Чемерис и др. (Chemeris et al.), 2022].

Поначалу благодаря выполнению стартовавшего в 1988 году международного проекта «Геном человека», выявление однонуклеотидных замен велось преимущественно для человека. Но по мере того как шло накопление подобных сведений и выяснилось, что это основной тип геномного полиморфизма [Brookes, 1999], его поиск стал проводиться и для других организмов, включая растения, с целью использования такой информации для улучшения сельскохозяйственных культур, что нашло отражение в одной из первых обзорных статей на эту тему [Rafalski, 2002]. В другой обзорной статье того же периода [Koeber, Summers, 2003],

посвященной исключительно пшенице, обсуждалась маркер-ориентированная селекция в XXI веке и прогнозировалось все большее вовлечение в нее однонуклеотидного полиморфизма. В том же году другими авторами была отмечена важность перехода в селекционных работах также на однонуклеотидный полиморфизм и описан поиск такого среди отдельных секвенированных EST участков ДНК гексаплоидной пшеницы [Somers et al., 2003]. Отечественными авторами кратко рассмотрены методы выявления однонуклеотидного полиморфизма и его использование в маркер-ориентированной селекции как раз на примере мягкой пшеницы [Хлесткина, Салина (Khlestkina, Salina), 2006]. Позже ими было показано, что однонуклеотидные замены, выбранные для мягкой пшеницы, не подходят для подобного анализа пшеницы Тимофеева и ржи [Козлова и др. (Kozlova et al.), 2009], поскольку, по сути, они видоспецифичны.

После того как появилась возможность секвенировать полные геномы сельскохозяйственных растений и животных, маркер-ориентированная селекция перешла на новый уровень благодаря большому количеству выявленных однонуклеотидных замен и появлению соответствующих ДНК-чипов, в том числе для пшеницы [Sun et al., 2020]. Это позволило осуществлять высокопроизводительный анализ однонуклеотидного полиморфизма, хотя в последние годы наблюдается тенденция изготовления подобных ДНК-чипов под заказ с конкретными заменами нуклеотидов для определенного вида. Другой подход заключается в анализе относительного небольшого количества однонуклеотидных замен у большого числа отдельных образцов, что в том числе продемонстрировано на пшенице [Bérard et al., 2009]. При этом обычная малопродуктивная детекция полиморфных нуклеотидов прочими методами своей актуальности не потеряла.

В планируемых нами обзорных статьях в большинстве случаев не будет стоять целью детальное рассмотрение различных методов детекции полиморфных нуклеотидов и уж тем более их применение (за некоторыми исключениями) для популяционных и прочих исследований полиморфизма ДНК. Заинтересовавшиеся тем или иным подходом читатели смогут более детально ознакомиться с ним с помощью приведенных ссылок на оригинальные, большей частью пионерные работы методического характера, которые, насколько это возможно, постараемся приводить в хронологическом порядке. Хотя нами проанализировано довольно большое число экспериментальных работ, мы далеки от мысли, что нам удалось собрать буквально всю имеющуюся литературу на этот счет. Здесь же в этой вводной статье предстоит составить лишь краткий

перечень основных подходов для выявления однонуклеотидного полиморфизма, разделив их на соответствующие группы, а также коснуться истории его изучения и используемых при этом терминов.

Что касается обнаружения однонуклеотидных замен *de novo*, то основным и фактически единственным подходом является секвенирование ДНК, как отдельных фрагментов, так и полногеномное, включая биоинформатический анализ, но они останутся за пределами рассмотрения.

Термины, понятия и определения однонуклеотидного полиморфизма

После начала массового секвенирования отдельных фрагментов ДНК, а затем и полных геномов организмов всех уровней генетической сложности стало абсолютно ясно, что наибольшие отличия между близкородственными организмами в сходных участках ДНК заключаются в происходящих заменах одиночных нуклеотидов, что получило название *single-nucleotide polymorphism*, или сокращенно SNP, читаемого как «снип»¹. В современной русскоязычной литературе, помимо снипов, можно встретить и аббревиатуру «ОНП» (однонуклеотидный полиморфизм) и непосредственно SNP.

В этой связи нужно заметить, что однонуклеотидный полиморфизм ДНК как таковой известен с начала 1980-х годов, но долгое время его называли иначе, причем по-разному. В англоязычной литературе можно было встретить *single-base-pair [nucleotide] substitution/mutation/alteration/variation*, а в отечественных - их переводы в виде однонуклеотидных замен/мутаций/изменений/вариаций. В одном из обзоров было использовано словосочетание “pre-SNPs-era [Kassam et al., 2005]. Были в ходу и такие термины как *point mutation* (точковая или точечная мутация), *biallelic marker* (биаллельный маркер). Для последнего термина требуется пояснить, что обнаруживаемый полиморфизм отдельных нуклеотидов носит преимущественно биаллельный характер, однако имеются примеры и большей вариабельности некоторых мест генома, о чем будет говорить дальше.

В настоящее время подобный полиморфизм ДНК в подавляющем большинстве случаев обозначается как SNP, ОНП либо снипы, поэтому в

этой и в последующих статьях на данную тему будем придерживаться этих уже устоявшихся обозначений. К сожалению, ни в одной из обзорных статей, посвященных снипам, нам не удалось найти указания - кем и когда в обиход были внедрены термин и аббревиатура SNP. Однако согласно базе данных PubMed, впервые обозначение однонуклеотидных замен (во множественном числе) как *single-nucleotide polymorphisms (SNPs)* встречается только в конце 1994 г. в методической работе, описывающей детекцию снипов с помощью подхода, названного *Genetic Bit Analysis* [Nikiforov et al., 1994]. При этом в 1995 г. в обзорной статье, опубликованной в конце ноября и посвященной полиморфизму ДНК человека [Guyer, Collins, 1995], такие места генома упоминаются еще как «*single-base mutations*», а в другой подобной обзорной статье 1997 г. [Kruglyak, 1997] и затем во всех последующих, речь идет уже об SNP². Впрочем, для однонуклеотидного полиморфизма можно встретить еще и другую аббревиатуру – SNV (*Single-Nucleotide Variation*), применяемую, когда частота нахождения минорного аллеля не установлена, притом, что для обычных снипов она должна составлять не менее 1% [Day, 2010].

Различных баз данных по снипам для разных организмов создано уже немало, однако, необходимо иметь в виду, что в силу возможных ошибок при секвенировании находящиеся в них сведения могут нести неточности. Так, в одной из работ было обнаружено, что 8,32% данных по снипам в dbSNP (NCBI) неверны, и для подобных «снипов» было предложено даже свое обозначение – SND – *Single-Nucleotide Difference* [Musumeci et al., 2010], что нужно учитывать при проведении исследований по ОНП.

Также следует принимать во внимание, что в виде полиморфных нуклеотидов в каждом снипе теоретически могут находиться все четыре азотистых основания. То есть потенциально все снипы в популяциях разных организмов (в том числе размножающихся половым путем) могут быть тетрааллельными. Однако в действительности намного чаще встречаются биаллельные снипы, для которых характерны только два полиморфных нуклеотида во

¹ Помимо замен одиночных нуклеотидов, полиморфные состояния ДНК могут быть вызваны инделами (инсерциями/делециями) либо также одиночных нуклеотидов, либо их блоков весьма разной протяженности, однако рассмотрение других типов полиморфизма ДНК в задачу ни этой, ни последующих наших статей на эту тему не входит.

² Справедливости ради необходимо заметить, что аббревиатура «SNP» может обозначать еще *sodium nitroprusside*, что следует принимать во внимание при проведении поиска по базам данных. Также можно ожидать расширение использования этой аббревиатуры SNP после приобретения ею нового значения – *silicene nanopore* (силициеновой нанопоры, являющейся аналогом графеновой), предлагаемой для секвенирования новейших поколений и уже используемой в литературе [Henry et al., 2021].

всех их возможных сочетаниях - транзиции $C \leftrightarrow T$ ($G \leftrightarrow A$) и трансверсии $C \leftrightarrow A$ ($G \leftrightarrow T$), $C \leftrightarrow G$ ($G \leftrightarrow C$), $T \leftrightarrow A$ ($A \leftrightarrow T$). При этом наиболее часто встречаются транзиции $C \leftrightarrow T$ ($G \leftrightarrow A$), по всей видимости, ввиду происходящего дезаминирования метилированных цитозинов и превращения последних сначала в урацилы, а затем при репликации - в тимины.

Возможно, стоит пояснить, что под тем или

5' - cttaggtcaagcagctcactcgacctNatggcttaggactcgcatactcgct - 3'

иным ОНП понимается не один конкретный полиморфный нуклеотид, а некий участок ДНК, этот нуклеотид содержащий (рис. 1). Именно по этим фланкирующим последовательностям нуклеотидов устанавливается локализация конкретного снипа в геноме, а в соответствующих базах данных ему присваивается порядковый номер - rs#.

Рис. 1. Однонуклеотидный полиморфизм ДНК на одной из парных хромосом, где строчными буквами показаны некие инвариантные нуклеотиды, а переменный нуклеотид в данном снипе изображен в виде **N**

Fig. 1. Single nucleotide polymorphism of DNA on one of the paired chromosomes, where some invariant nucleotides are shown in lowercase letters, and the variable nucleotide in this SNP is depicted as **N**

В ряду поколений у размножающихся половым путем организмов любой три- или тетрааллельный снип, имеющий высокую частоту преимущественно только двух нуклеотидов, неизбежно будет стремиться к биаллельности. В связи с этим, три- и тетрааллельные снипы довольно редки; тем не менее, у человека их выявлено уже немало. В цитированной выше работе [Somers et al., 2003], описывающей поиск ОНП в секвенированных фрагментах ДНК гексаплоидной пшеницы, упоминается о нахождении преимущественно биаллельных снипов и лишь изредка триаллельных, тогда как тетрааллельных снипов выявлено не было.

Би-, три- и тетрааллельные снипы иногда объединяют одним термином – мультиаллельные. В одной из довольно старых работ [Gilles et al., 1999] при описании снипов с встречаемостью всех четырех нуклеотидов нам встретился термин “quadra-allelic SNP”, но распространения он не получил. Причем у одного размножающегося половым путем конкретного диплоидного организма (включая человека), в силу двуродительской природы в геноме (в конкретном снипе) будет не более двух разных полиморфных нуклеотидов. Во избежание недоразумений следует пояснить, что, говоря о присутствии в биаллельных снипах только двух нуклеотидов, имеется в виду лишь одна цепь ДНК. Ее условно можно назвать «верхней», тогда как комплементарная ей «нижняя» цепь ДНК обычно остается за пределами рассмотрения. Так, например, если у некоего человека в каком-либо снипе на хромосоме, полученной от одного из родителей, находится гуанин на «верхней» цепи ДНК, то на «нижней» цепи будет располагаться комплементарный ему цитозин (также доставшийся от того же родителя), и если при этом на хромосоме от другого родителя присутствует аденин на условно «верхней» цепи ДНК, на «нижней» будет тогда тимин. То есть у одного человека в этом биаллельном снипе с

учетом двуродительской природы и наличия парных хромосом, а также двухпочечного устройства молекул ДНК будут находиться доставшиеся ему от отца и от матери все четыре азотистых основания, но от этого данный снип тетрааллельным не становится, поскольку *in silico* принято оперировать и хранить в базах данных информацию только об одной (условно верхней) цепи ДНК. Таким образом, в данном примере этот снип является биаллельным и несущим в двух своих аллелях полиморфные нуклеотиды G и A, доставшиеся ему от разных родителей.

Отчасти по причине преимущественной биаллельности снипов, подавляющее большинство методов их детекции рассчитаны именно на выявление только двух разных нуклеотидов. Однако при этом могут быть пропущены другие, не принимаемые в расчет нуклеотиды, поскольку они даже не ищутся. Вероятность подобных событий исключать нельзя, и в качестве подтверждения этому можно сослаться на целый ряд статей, в которых продемонстрированы ситуации с получением ложных сведений о представленности у людей определенных азотистых оснований в снипах, считавшихся биаллельными, тогда как на самом деле они как минимум триаллельны, а то и тетрааллельны [Phillips et al., 2004; Morita et al., 2007; Westen et al., 2009; Zha et al., 2011; 2012; Phillips et al., 2015; Liu et al., 2017; Gao et al., 2018; Cornelis et al., 2019]. При этом нельзя исключать, что три- и даже тетрааллельные снипы могут встречаться и у других организмов, и мягкая пшеница тому пример, хотя она представляет собой гексаплоидный организм, состоящий из трех субгеномов **B**, **A** и **D** [Кулуев и др. (Kuluev et al.), 2018], каждый из которых несет свои снипы. Поэтому по возможности необходимо вести детекцию всех четырех нуклеотидов в любых снипах³, но ввиду

³ Для некоторых случаев детекцию всех четырех нуклеотидов в любых снипах можно считать просто

экономии расходных материалов обычно этого не делают. Тем не менее, многие из методов, упоминаемых в данной и описываемых в последующих статьях, могут быть адаптированы для поиска в снипах всех четырех азотистых оснований.

Краткий перечень основных подходов детекции уже известных снипов

Методов анализа известных снипов (генотипирования) с бесчисленными вариациями существует огромное множество, но все они могут быть сведены в несколько групп, исходя из принципа детекции полиморфного нуклеотида. При этом для одного и того же подхода могут применяться различные способы получения конечного результата, как использующие довольно простые процедуры, так и эксплуатирующие дорогостоящее высокотехнологичное оборудование. Определенную проблему для всех методов представляет чувствительность детекции, поскольку при размере содержащего полиморфный нуклеотид фрагмента ДНК, равного, например, 60 п.н., он будет составлять приблизительно одну стомиллионную долю от диплоидного генома человека, и выявить его на фоне всей остальной геномной ДНК непросто. На помощь здесь приходят различные методы специфичной амплификации нужных участков ДНК с помощью ПЦР или других аналогичных реакций, либо используя методы, основанные на накоплении детектируемого сигнала при работе с единичными копиями определенного снипа, хотя в ранних экспериментах обеспечение нужной чувствительности часто достигалось за счет использования радиоактивности, которой метился специальный гибридизационный олигонуклеотидный зонд, получивший название ASO – Allele-Specific Oligonucleotide. Данный подход не забыт, и в настоящее время полностью или частично спаренные дуплексы исследуют разнообразными способами, в основе которых лежит различная прочность таких структур. ASO-пробы трансформировались на сегодня во флуоресцентные гибридизационные зонды типа TaqMan, Molecular Beacon и им подобные, с помощью которых в режиме реального времени в соответствующих ДНК-термоциклерах ведется детекция полиморфных нуклеотидов в снипах.

Одним из простых способов анализа ОНП является подход с использованием рестрикционных эндонуклеаз, сайты узнавания которых приходится на

обязательной. Например, при ДНК-идентификации личности на основе однонуклеотидного полиморфизма, описанной нами ранее [Чемерис и др. (Chemeris et al.), 2018; Анисимов и др. (Anisimov et al.), 2019; Чемерис и др. (Chemeris et al.), 2022; Garafutdinov et al., 2020].

полиморфный нуклеотид, в основе которого лежит расщепление ампликона, наработанного, например, в ПЦР. Данный метод получил название PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) или ПЦР-ПДРФ (Полиморфизм Длины Рестрикционных Фрагментов). Он имеет серьезное ограничение, связанное с тем, что лишь немногие снипы приходится на сайты рестрикционных эндонуклеаз, хотя были предложены варианты ПЦР-ПДРФ, позволяющие обходить это ограничение, о чем будет говориться в следующей нашей статье, посвященной этому методу детекции снипов [Сахабутдинова и др. (Sakhabutdinova et al.), 2021]. Помимо рестриктазного расщепления ампликонов, находят применение и другие ферменты, что привело, например, к разработке так называемого инвазивного расщепления с помощью Flap эндонуклеазы.

Широко применяемым способом выявления однонуклеотидных замен является аллель-специфичная ПЦР, в которой используются специфичные к тому или иному полиморфному нуклеотиду праймеры. При этом детекция амплификации осуществляется разными способами, среди которых значительную долю занимают гель-электрофоретическое разделение продуктов ПЦР и различие в интенсивности свечении реакционных смесей благодаря применению праймеров, меченных флуорохромами. Аллель-специфичные праймеры, помимо ПЦР, применяются и в реакциях изотермической амплификации, например, в реакции петлевой амплификации (LAMP – Loop AMPification), которой недавно мы также уделили значительное внимание [Гарафутдинов и др. (Garafutdinov et al.), 2021].

Разновидностью аллель-специфичной ПЦР можно считать однонуклеотидное удлинение праймера, который либо несет дискриминирующий нуклеотид на своем 3'-конце, либо таковой должен встраиваться ДНК полимеразой. Этот подход весьма популярен и имеет множество вариаций, в том числе в виде способов получения результатов, свидетельствующих о присутствии в снипе конкретного нуклеотида, среди которых может быть так называемое минисеквенирование, электрохимическая детекция, флуоресценция и хемилюминесценция, поляризация, FRET-эффект, разделение конечных продуктов с помощью времяпролетной масс-спектрометрии и пр. Активно применяется плавление ампликонов, которое необходимо проводить в ДНК-термоциклерах с оптическим модулем с так называемой HRM (High Resolution Melting) опцией, позволяющих в режиме реального времени улавливать тонкие различия в температурах плавления ампликонов в зависимости от

присутствующих в них тех или иных азотистых оснований.

Дискриминирующие нуклеотиды могут быть расположены на концах олигонуклеотидов, которые приходятся на место лигирования с последующей детекцией целевых продуктов или с помощью лигазной цепной реакции, либо той же ПЦР, матрицей в которой выступает продукт лигирования. В сопряжении с дискриминирующим лигированием могут использоваться и методы изотермической амплификации, в частности, основанные на амплификации по типу катящегося кольца (RCA – Rolling Circle Amplification), рассмотренной нами недавно довольно подробно [Гарафутдинов и др. (Garafutdinov et al.), 2021a].

Ряд методов основан на различиях в электрофоретической подвижности ампликонов с полиморфными нуклеотидами, к которым можно отнести такие методы как SSCP (Single-Stranded Conformation Polymorphism) или TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis), в которых разделяются частично денатурированные молекулы ДНК. Вместо гель-электрофореза для этих целей может использоваться и высокоэффективная жидкостная хроматография DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography) в денатурирующих условиях.

К высокопроизводительным способам детекции известных снипов относятся использование ДНК-чипов, целый ряд которых для многих видов организмов реализован в виде коммерческих продуктов, включая изготавливаемые под заказ.

Есть еще масса методов детекции полиморфных нуклеотидов в известных снипах, но они не получили широко распространения, чтобы быть упомянутыми здесь, но о них так или иначе будет говориться в последующих обзорных статьях. Наконец, детекция полиморфных нуклеотидов в известных снипах может осуществляться с помощью все того же секвенирования после наработки соответствующих ампликонов с помощью подходящих реакций амплификации нужных фрагментов ДНК.

Заключение

В данной вводной статье к описанию огромного разнообразия методов детекции однонуклеотидного полиморфизма ДНК были лишь кратко упомянуты только основные подходы, поскольку их рассмотрение будет проведено в серии сопровождающих эту работу публикаций, одна из которых представлена уже в этом номере журнала [Сахабутдинова и др. (Sakhabutdinova et al.), 2021]. Насколько можем судить, это будет наиболее полный анализ всевозможных методов детекции однонуклеотидных замен, включая их поистине бесчисленные вариации. Забегая вперед скажем, что в

готовящейся обзорной статье, посвященной аллель-специфичной ПЦР, будет рассмотрено около полусотни способов ее проведения, чего не сделано ни в одной другой подобной публикации.

Благодарности

Исследование выполнено в рамках государственных заданий №№ 122030200143-8, АААА-А21-121011990119-1 и АААА-А21-121011990120-7, а также при поддержке гранта Минобрнауки РФ (соглашение № 075-15-2021-1066 от 28 сентября 2021 г.).

Литература

1. Анисимов В.А., Гарафутдинов Р.Р., Сагитов А.М., Сахабутдинова А.Р., Хуснутдинова Э.К., Аминев Ф.Г., Чемерис А.В. ДНК-криминалистика – зарождение, современность и перспективы // *Биомика*. 2019. Т.11(3). С. 282-314. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2019-26
2. Гарафутдинов Р.Р., Баймиев Ан.Х., Малеев Г.В., Алексеев Я.И., Зубов В.В., Чемерис Д.А., Кирьянова О.Ю., Губайдуллин И.М., Матниязов Р.Т., Сахабутдинова А.Р., Никоноров Ю.М., Кулуев Б.Р., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. Разнообразие праймеров для ПЦР и принципы их подбора // *Биомика*. 2019. Т.11(1). С. 23 – 70. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2019-04
3. Гарафутдинов Р.Р., Чемерис Д.А., Мавзютов А.Р., Ахметзянова Л.У., Давлеткулов Т.М., Губайдуллин И.М., Чемерис А.В. Петлевая LAMP амплификация нуклеиновых кислот. I. Два десятилетия развития и совершенствования // *Biomics*. 2021. Т.13(2). С. 176-226. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2021-14
4. Гарафутдинов Р.Р., Сахабутдинова А.Р., Гильванов А.Р., Чемерис А.В. Амплификация нуклеиновых кислот “катящимся кольцом” – универсальный метод анализа широкого круга биологических мишеней // *Биоорганическая химия*. 2021. Т.47(6). С.721–740. DOI: 10.31857/S0132342321060075
5. Козлова С.А., Хлесткина Е.К., Салина Е.А. Особенности применения SNP-маркеров, разработанных для аллополиплоидной пшеницы // *Генетика*. 2009. Т.45(1). С. 92-96.
6. Кулуев А.Р., Матниязов Р.Т., Чемерис Д.А., Чемерис А.В. Современные представления о родственных взаимоотношениях в пшенично-эгилопсом альянсе (с краткой исторической справкой) // *Biomics*. 2016. Т. 8. № 4. С. 297-310.
7. Сахабутдинова А.Р., Гарафутдинов Р.Р., Чемерис Д.А., Кулуев А.Р., Кулуев И.Р., ¹Чемерис А.В. Разнообразие методов детекции полиморфных нуклеотидов в известных снипах. II. Аллель-

- специфичная гибридизация, ПЦР-ПДРФ, химический и ферментативный методы детекции мутаций в гетеродуплексах // *Биомика*. 2021. Т.13(4). С.444-456. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2021-31
8. Хлесткина Е. К., Салина Е.А. SNP-маркеры: методы анализа, способы разработки и сравнительная характеристика на примере мягкой пшеницы // *Генетика*. 2006. Т. 42(6). С. 725-736.
 9. Чемерис А.В., Аминев Ф.Г., Гарафутдинов Р.Р., Анисимов В.А., Сагитов А.М., Хуснутдинова Э.К., Сахабутдинова А.Р., Чемерис Д.А., Михайленко К.И. ДНК-криминалистика. М.: Наука. 2022. 466 С.
 10. Чемерис Д.А., Сагитов А.М., Аминев Ф.Г., Луценко В.И., Гарафутдинов Р.Р., Сахабутдинова А.Р., Василев Р.Г., Алексеев Я.И., Сломинский П.А., Хуснутдинова Э.К., Чемерис А.В. Эволюция подходов к ДНК-идентификации личности // *Биомика*. 2018. Т.10(1). С.85-140. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-16
 11. Чемерис Д.А., Кирьянова О.Ю., Губайдуллин И.М., Чемерис А.В. Дизайн праймеров для полимеразной цепной реакции (краткий обзор компьютерных программ и баз данных) // *Биомика*. 2016. Т. 8. № 3. С. 215-238.
 12. Bérard A, Le Paslier MC, Dardevet M, Exbrayat-Vinson F, Bonnin I, Cenci A, Haudry A, Brunel D, Ravel C. High-throughput single nucleotide polymorphism genotyping in wheat (*Triticum* spp.) // *Plant Biotechnol J*. 2009. V.7(4). P.364-374. doi: 10.1111/j.1467-7652.2009.00404.x
 13. Brookes A.J. The essence of SNPs // *Gene*. 1999. V.234(2). P.177-186. doi: 10.1016/s0378-1119(99)00219-x
 14. Cornelis S, Gansemans Y, Vander Plaetsen AS, Weymaere J, Willems S, Deforce D, Van Nieuwerburgh F. Forensic tri-allelic SNP genotyping using nanopore sequencing // *Forensic Sci Int Genet*. 2019. V.38. P.204-210. doi: 10.1016/j.fsigen.2018.11.012
 15. Day I.N. dbSNP in the detail and copy number complexities // *Hum. Mutat*. 2010. V. 31(1). P. 2-4. doi: 10.1002/humu.21149.
 16. Ding C, Jin S. High-throughput methods for SNP genotyping // *Methods Mol Biol*. 2009. V.578. P.245-254. doi: 10.1007/978-1-60327-411-1_16.
 17. Gao Z, Chen X, Zhao Y, Zhao X, Zhang S, Yang Y, Wang Y, Zhang J. Forensic genetic informativeness of an SNP panel consisting of 19 multi-allelic SNPs // *Forensic Sci Int Genet*. 2018. V.34. P.49-56. doi: 10.1016/j.fsigen.2018.01.006
 18. Garafutdinov R.R., Sakhabutdinova A.R., Slominsky P.A., Aminev F.G., Chemeris A.V. A new digital approach to SNP encoding for DNA identification // *Forensic Science International*. 2020. V. 317. P. 110-520. DOI: 10.1016/j.forsciint.2020.110520
 19. Gilles P.N., Wu D.J., Foster C.B., Dillon P.J., Chanock S.J. Single nucleotide polymorphic discrimination by an electronic dot blot assay on semiconductor microchips // *Nat. Biotechnol*. 1999. V. 17(4). P. 365-370. doi: 10.1038/7921.
 20. Guyer MS, Collins FS. How is the Human Genome Project doing, and what have we learned so far? // *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995 Nov 21;92(24):10841-8. doi: 10.1073/pnas.92.24.10841
 21. Henry M.B., Tumbapo M., Tayo B.O. Identification of DNA bases using nanopores created in finite-size nanoribbons from graphene, phosphorene, and silicone // *AIP Advances*. 2021. V.11. 035324. doi: 10.1063/5.0043000
 22. Kassam S, Meyer P, Corfield A, Mikuz G, Sergi C. Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs): History, Biotechnological Outlook and Practical Applications // *Current Pharmacogenomics*. 2005. V.3(3). P.237-245. doi: 10.2174/1570160054864021
 23. Kim S, Misra A. SNP genotyping: technologies and biomedical applications // *Annu Rev Biomed Eng*. 2007. V.9. P.289-320. doi: 10.1146/annurev.bioeng.9.060906.152037
 24. Koebner RMD, Summers RW. 21st century wheat breeding: plot selection or plate detection? // *Trends Biotechnol*. 2003 Feb;21(2):59-63. doi: 10.1016/S0167-7799(02)00036-7.
 25. Kruglyak L. The use of a genetic map of biallelic markers in linkage studies // *Nat Genet*. 1997 Sep;17(1):21-4. doi: 10.1038/ng0997-21
 26. Kwok P.Y. Methods for genotyping single nucleotide polymorphisms // *Ann. Rev. Genomics Hum. Genet*. 2001. V. 2. P. 235-258. doi: 10.1146/annurev.genom.2.1.235.
 27. Kwok P.Y., Chen X. Detection of single nucleotide polymorphisms // *Curr. Issues Mol. Biol*. 2003. V. 5(2). P. 43-60.
 28. Liu Y, Liao H, Liu Y, Guo J, Sun Y, Fu X, Xiao D, Cai J, Lan L, Xie P, Zha L. Developing a new nonbinary SNP fluorescent multiplex detection system for forensic application in China // *Electrophoresis*. 2017. V.38(8). P.1154-1162. doi: 10.1002/elps.201600379
 29. Morita A, Nakayama T, Doba N, Hinohara S, Mizutani T, Soma M. Genotyping of triallelic SNPs using TaqMan PCR // *Mol Cell Probes*. 2007. V.21(3). P.171-176. doi: 10.1016/j.mcp.2006.10.005
 30. Musumeci L., Arthur J.W., Cheung F.S., Hoque A., Lippman S., Reichardt J.K. Single nucleotide differences (SNDs) in the dbSNP database may lead to errors in genotyping and haplotyping studies // *Hum. Mutat*. 2010. V. 31(1). P. 67-73. doi: 10.1002/humu.21137.
 31. Nikiforov TT, Rendle RB, Goelet P, Rogers YH, Kotewicz ML, Anderson S, Trainor GL, Knapp MR. Genetic Bit Analysis: a solid phase method for typing single nucleotide polymorphisms // *Nucleic Acids Res*.

1994. V.22(20). P.4167-4175. doi: 10.1093/nar/22.20.4167
32. Parsons BL, Heflich RH. Genotypic selection methods for the direct analysis of point mutations // *Mutat Res*. 1997 V.387(2). P.97-121. doi: 10.1016/s1383-5742(97)00026-4.
33. Phillips C, Amigo J, Carracedo Á, Lareu MV. Tetra-allelic SNPs: Informative forensic markers compiled from public whole-genome sequence data // *Forensic Sci Int Genet*. 2015. V.19. P.100-106. doi: 10.1016/j.fsigen.2015.06.011
34. Phillips C, Lareu V, Salas A, Carracedo A. Nonbinary single-nucleotide polymorphism markers // *International Congress Series*. 2004. V.1261. P. 27-29, doi: 10.1016/j.ics.2003.12.008
35. Rafalski A. Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics // *Curr Opin Plant Biol*. 2002. V.5(2). P.94-100. doi: 10.1016/s1369-5266(02)00240-6.
36. Somers DJ, Kirkpatrick R, Moniwa M, Walsh A. Mining single-nucleotide polymorphisms from hexaploid wheat ESTs // *Genome*. 2003 Jun;46(3):431-7. doi: 10.1139/g03-027.
37. Sun C, Dong Z, Zhao L, Ren Y, Zhang N, Chen F. The Wheat 660K SNP array demonstrates great potential for marker-assisted selection in polyploid wheat // *Plant Biotechnol J*. 2020 Jun;18(6):1354-1360. doi: 10.1111/pbi.13361
38. Westen AA, Matai AS, Laros JF, Meiland HC, Jasper M, de Leeuw WJ, de Knijff P, Sijen T. Tri-allelic SNP markers enable analysis of mixed and degraded DNA samples // *Forensic Sci Int Genet*. 2009. V.3(4). P.233-241. doi: 10.1016/j.fsigen.2009.02.003
39. Zha L, Yun L, Chen P, Luo H, Yan J, Hou Y. Exploring of tri-allelic SNPs using pyrosequencing and the SNaPshot methods for forensic application // *Electrophoresis*. 2012. V.33(5). P.841-848. doi: 10.1002/elps.201100508
40. Zha L, Yun LB, Luo HB, Yan J, Hou YP. Analysis of tri-allelic SNPs for forensic purpose in Chinese Han population // *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*. 2011. V.3(1). e107-e108. 768. doi: 10.1016/j.fsigs.2011.08.053
3. Brookes A.J. The essence of SNPs. *Gene*. 1999. V.234(2). P.177-186. doi: 10.1016/s0378-1119(99)00219-x
4. Chemeris A.V., Aminev F.G., Garafutdinov R.R., Anisimov V.A., Sagitov A.M., Khusnutdinova E.K., Sakhabutdinova A.R., Chemeris D.A., Mihaylenko K.I. DNK-kriminalistika. M.: Nauka. 2022. 466 S. [DNA criminalistics] (In Russian)
5. Chemeris D.A., Sagitov A.M., Aminev F.G., Lutsenko V.I., Garafutdinov R.R., Sakhabutdinova A.R., Vasilov R.G., Alexeyev Ya.I., Slominsky P.A., Khusnutdinova E.K., Chemeris A.V. The evolution of approaches to DNA identification of personality. *Biomics*. 2018. V.10(1). P.85-140. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-16 (In Russian)
6. Chemeris D.A., Kiryanova O.Yu., Gubaydullin I.M., Chemeris A.V. Design of primers for polymerase chain reaction (Brief review of software and databases). *Biomics*. 2016. V. 8(3). P.215-238. (In Russian)
7. Cornelis S, Gansemans Y, Vander Plaetsen AS, Weymaere J, Willems S, Deforce D, Van Nieuwerburgh F. Forensic tri-allelic SNP genotyping using nanopore sequencing. *Forensic Sci Int Genet*. 2019. V.38. P.204-210. doi: 10.1016/j.fsigen.2018.11.012
8. Day I.N. dbSNP in the detail and copy number complexities // *Hum. Mutat*. 2010. V. 31(1). P. 2-4. doi: 10.1002/humu.21149.
9. Ding C, Jin S. High-throughput methods for SNP genotyping. *Methods Mol Biol*. 2009. V.578. P.245-254. doi: 10.1007/978-1-60327-411-1_16.
10. Gao Z, Chen X, Zhao Y, Zhao X, Zhang S, Yang Y, Wang Y, Zhang J. Forensic genetic informativeness of an SNP panel consisting of 19 multi-allelic SNPs. *Forensic Sci Int Genet*. 2018. V.34. P.49-56. doi: 10.1016/j.fsigen.2018.01.006
11. Garafutdinov R.R., Baymiev An.Kh., Maleev G.V., Alexeyev Ya.I., Zubov V.V., Chemeris D.A., Kiryanova J.Yu., Gubaydullin I.M., Matniyazov R.T., Sakhabutdinova A.R., Nikonorov Yu.M., Kuluev B.R., Baymiev Al.Kh., Chemeris A.V. Diversity of PCR primers and principles of their design. *Biomics*. 2019. V.11(1). P.23-70. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2019-04 (In Russian)
12. Garafutdinov R.R., Chemeris D.A., Mavzyutov A.R., Akhmetzyanova L.U., Davletkulov T.M., Gubaydullin I.M., Chemeris A.V. LAMP amplification of nucleic acids. I. Two decades of development and improvement. *Biomics*. 2021. V.13(2). P. 176-226. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2021-14 (In Russian)
13. Garafutdinov RR, Sakhabutdinova AR, Gilvanov AR, Chemeris AV. Rolling Circle Amplification as a Universal Method for the Analysis of a Wide Range of Biological Targets. *Russ J Bioorg Chem*. 2021. V.47(6). P.1172-1189. doi: 10.1134/S1068162021060078

References

1. Anisimov V.A., Garafutdinov R.R., Sagitov A.M., Sakhabutdinova A.R., Khusnutdinova E.K., Aminev F.G., Chemeris A.V. DNA forensics – the origin, present state and future prospects. *Biomics*. 2019. V.11(3). P. 282-314. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2019-26 (In Russian)
2. Bérard A, Le Paslier MC, Dardevet M, Exbrayat-Vinson F, Bonnin I, Cenci A, Haudry A, Brunel D, Ravel C. High-throughput single nucleotide polymorphism genotyping in wheat (*Triticum* spp.). *Plant Biotechnol J*. 2009. V.7(4). P.364-374. doi: 10.1111/j.1467-

14. Garafutdinov R.R., Sakhabutdinova A.R., Slominsky P.A., Aminev F.G., Chemeris A.V. A new digital approach to SNP encoding for DNA identification. *Forensic Science International*. 2020. V. 317. P. 110-520. DOI: 10.1016/j.forsciint.2020.110520
15. Gilles P.N., Wu D.J., Foster C.B., Dillon P.J., Chanock S.J. Single nucleotide polymorphic discrimination by an electronic dot blot assay on semiconductor microchips. *Nat. Biotechnol.* 1999. V. 17(4). P. 365-370. doi: 10.1038/7921.
16. Guyer MS, Collins FS. How is the Human Genome Project doing, and what have we learned so far? *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995 Nov 21;92(24):10841-8. doi: 10.1073/pnas.92.24.10841
17. Henry M.B., Tumbapo M., Tayo B.O. Identification of DNA bases using nanopores created in finite-size nanoribbons from graphene, phosphorene, and silicone. *AIP Advances*. 2021. V.11. 035324. doi: 10.1063/5.0043000
18. Kassam S, Meyer P, Corfield A, Mikuz G, Sergi C. Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs): History, Biotechnological Outlook and Practical Applications // *Current Pharmacogenomics*. 2005. V.3(3). P.237-245. doi: 10.2174/1570160054864021
19. Khlestkina E.K., Salina E.A. SNP markers: methods of analysis, ways of development, and comparison on an example of common wheat. *Genetika*. 2006. V.42(6). P.725-36. DOI: 10.1134/S1022795406060019
20. Kim S, Misra A. SNP genotyping: technologies and biomedical applications. *Annu Rev Biomed Eng*. 2007. V.9. P.289-320. doi: 10.1146/annurev.bioeng.9.060906.152037
21. Koebner RMD, Summers RW. 21st century wheat breeding: plot selection or plate detection? *Trends Biotechnol.* 2003 Feb;21(2):59-63. doi: 10.1016/S0167-7799(02)00036-7.
22. Kozlova SA, Khlestkina EK, Salina EA. Use of SNP markers developed for allopolyploid wheat. *Genetika*. 2009. V.45(1). P.92-96.
23. Kruglyak L. The use of a genetic map of biallelic markers in linkage studies. *Nat Genet.* 1997 Sep;17(1):21-4. doi: 10.1038/ng0997-21
24. Kuluev A.R., Matniyazov R.T., Chemeris D.A., Chemeris A.V. Modern concepts about relationships in the wheat-aegilops alliance (with a brief historical note). *Biomics*. 2016. V.8(4). P. 297-310. (In Russian)
25. Kwok P.Y. Methods for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Ann. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2001. V. 2. P. 235-258. doi: 10.1146/annurev.genom.2.1.235.
26. Kwok P.Y., Chen X. Detection of single nucleotide polymorphisms. *Curr. Issues Mol. Biol.* 2003. V. 5(2). P. 43-60.
27. Liu Y, Liao H, Liu Y, Guo J, Sun Y, Fu X, Xiao D, Cai J, Lan L, Xie P, Zha L. Developing a new nonbinary SNP fluorescent multiplex detection system for forensic application in China. *Electrophoresis*. 2017. V.38(8). P.1154-1162. doi: 10.1002/elps.201600379
28. Morita A, Nakayama T, Doba N, Hinohara S, Mizutani T, Soma M. Genotyping of triallelic SNPs using TaqMan PCR. *Mol Cell Probes*. 2007. V.21(3). P.171-176. doi: 10.1016/j.mcp.2006.10.005
29. Musumeci L., Arthur J.W., Cheung F.S., Hoque A., Lippman S., Reichardt J.K. Single nucleotide differences (SNDs) in the dbSNP database may lead to errors in genotyping and haplotyping studies. *Hum. Mutat.* 2010. V. 31(1). P. 67-73. doi: 10.1002/humu.21137.
30. Nikiforov TT, Rendle RB, Goelet P, Rogers YH, Kotewicz ML, Anderson S, Trainor GL, Knapp MR. Genetic Bit Analysis: a solid phase method for typing single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res*. 1994. V.22(20). P.4167-4175. doi: 10.1093/nar/22.20.4167
31. Parsons BL, Heflich RH. Genotypic selection methods for the direct analysis of point mutations. *Mutat Res*. 1997 V.387(2). P.97-121. doi: 10.1016/s1383-5742(97)00026-4.
32. Phillips C, Amigo J, Carracedo Á, Lareu MV. Tetra-allelic SNPs: Informative forensic markers compiled from public whole-genome sequence data. *Forensic Sci Int Genet*. 2015. V.19. P.100-106. doi: 10.1016/j.fsigen.2015.06.011
33. Phillips C, Lareu V, Salas A, Carracedo A. Nonbinary single-nucleotide polymorphism markers. *International Congress Series*. 2004. V.1261. P. 27-29, doi: 10.1016/j.ics.2003.12.008
34. Rafalski A. Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. *Curr Opin Plant Biol*. 2002. V.5(2). P.94-100. doi: 10.1016/s1369-5266(02)00240-6.
35. Sakhabutdinova A.R., Garafutdinov R.R., Chemeris D.A., Kuluev A.R., Kuluev B.R., Chemeris A.V. The diversity of methods for the detection of polymorphic nucleotides in the known SNPs. II. Allele-specific hybridization, PCR-RFLP chemical and enzymatic methods for detecting mutations in heteroduplexes. *Biomics*. 2021. V.13(4). P.444-456. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2021-31 (In Russian)
36. Somers DJ, Kirkpatrick R, Moniwa M, Walsh A. Mining single-nucleotide polymorphisms from hexaploid wheat ESTs. *Genome*. 2003 Jun;46(3):431-7. doi: 10.1139/g03-027.
37. Sun C, Dong Z, Zhao L, Ren Y, Zhang N, Chen F. The Wheat 660K SNP array demonstrates great potential for marker-assisted selection in polyploid wheat. *Plant Biotechnol J*. 2020 Jun;18(6):1354-1360. doi: 10.1111/pbi.13361
38. Westen AA, Matai AS, Laros JF, Meiland HC,

- Jasper M, de Leeuw WJ, de Knijff P, Sijen T. Tri-allelic SNP markers enable analysis of mixed and degraded DNA samples. *Forensic Sci Int Genet.* 2009. V.3(4). P.233-241. doi: 10.1016/j.fsigen.2009.02.003
39. Zha L, Yun L, Chen P, Luo H, Yan J, Hou Y. Exploring of tri-allelic SNPs using pyrosequencing and the SNaPshot methods for forensic application. *Electrophoresis.* 2012. V.33(5). P.841-848. doi: 10.1002/elps.201100508
40. Zha L, Yun LB, Luo HB, Yan J, Hou YP. Analysis of tri-allelic SNPs for forensic purpose in Chinese Han population. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series.* 2011. V.3(1). e107-e108. 768. doi: 10.1016/j.fsigss.2011.08.053