



ВЛИЯНИЕ ТЯЖЕЛОЙ ВОДЫ НА ПРОТЕКАНИЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Сахабутдинова А.Р., Гарафутдинов Р.Р., Чемерис А.В.

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

Резюме

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) является основным и широко применяемым способом амплификации нуклеиновых кислот *in vitro*. Предложенная почти 40 лет назад, ПЦР получила с тех пор значительное развитие; были предложены не только различные варианты проведения этой реакции, но и существенные модификации метода. Однако несмотря на имеющиеся достижения, совершенствование ПЦР, обусловленное необходимостью решения новых сложных задач, продолжается до сих пор. Одним из способов повышения специфичности и чувствительности ПЦР является добавление в реакционные смеси низкомолекулярных соединений - так называемых ПЦР-энхансеров, среди которых наиболее популярным является диметилсульфоксид (ДМСО). В данной работе нами впервые описывается возможность использования в качестве ПЦР-энхансера дейтерированной (тяжелой) воды - D₂O. На примере GC-богатых нуклеотидных последовательностей гена 28S рРНК богомола обыкновенного показано, что наибольший эффект данный агент оказывает при его содержании более 50% от объема ПЦР-смеси и при амплификации относительно протяженных GC-богатых нуклеотидных последовательностей.

Ключевые слова: полимеразная цепная реакция (ПЦР), нуклеиновые кислоты, тяжелая вода, эффективность ПЦР

Цитирование: Сахабутдинова А.Р., Гарафутдинов Р.Р., Чемерис А.В. Влияние тяжелой воды на протекание полимеразной цепной реакции // *Biomics*. 2022. Т.14(1). С.52-58. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2022-3

© Авторы

THE INFLUENCE OF HEAVY WATER ON POLYMERASE CHAIN REACTION

Sakhabutdinova A.R., Garafutdinov R.R., Chemeris A.V.

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

Resume

Polymerase chain reaction (PCR) is the main and widely used method for nucleic acids amplification. PCR, which developed almost 40 years ago, has undergone significant development. Different variations and significant modifications of the method were also proposed. However, despite the achievements, the improvement of PCR, due to the need to solve new complex problems, continues. One way to increase the specificity and sensitivity of PCR is to add low molecular weight compounds, so-called PCR enhancers, among which dimethyl sulfoxide (DMSO) is the most popular. In this study, we describe for the first time the possibility of using heavy water (D₂O), as a PCR enhancer. It has been shown that D₂O affects on PCR

efficiency when the content of heavy water in the reaction mixture exceeds 50% and during amplification of relatively extended GC-rich nucleotide sequences.

Keywords: polymerase chain reaction (PCR), nucleic acids, heavy water, PCR efficiency

Citation: Sakhabutdinova A.R., Garafutdinov R.R., Chemeris A.V. The influence of heavy water on polymerase chain reaction. *Biomics*. 2022. V.14(1). P. 52-58. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2022-3 (In Russian)

© The Authors

Введение

Предложенная более 30 лет назад полимеразная цепная реакция (ПЦР) до сих пор остается основным методом амплификации нуклеиновых кислот [Saiki et al., 1985]. За время, прошедшее с момента открытия ПЦР, предложено огромное количество ее вариантов [Behlke et al., 2019]. Предлагались различные способы улучшения этой реакции, направленные в основном на повышение специфичности, чувствительности и скорости реакции для того, чтобы можно было амплифицировать GC-богатые последовательности [Green, Sambrook, 2019] или препараты нуклеиновых кислот, содержащие ингибиторы ПЦР [Turner, Jenkins, 1995; Wilson, 1997] или разрушенную ДНК [Garafutdinov et al., 2017]. Одним из приемов повышения эффективности ПЦР является использование низкомолекулярных добавок, называемых ПЦР-энхансерами. Впервые об улучшении ПЦР путем добавления диметилсульфоксида [Bookstein et al., 1990] и формамида [Sarkar et al., 1990] сообщалось еще в 1990. Позднее было показано также влияние детергентов [Demeke, Adams, 1992], солей тетраалкиламмония [Chevet et al., 1995], белков [Kreader, 1996], бетаина [Henke et al., 1997], сульфонов [Chakrabarti, Schutt, 2001], сульфоксидов [Chakrabarti, Schutt, 2002], гликолей [Zhang et al., 2009], эктоинов [Meyer et al., 2017; Хасанова и др., 2019] на ПЦР. Особый интерес в качестве ПЦР-энхансеров вызывают углеводы ввиду их доступности и безопасности [Demeke, Adams, 1992; Spiess et al., 2004]. На практике используют только трегалозу, которая способствует более надежному протеканию ПЦР за счет термостабилизации ДНК-полимеразы [Spiess et al., 2004], а также применяется для длительного хранения ДНК [Гарафутдинов и др., 2020]. Ранее нами было показано, что эффективным ПЦР-энхансером является более доступная сахароза, обеспечивающая значительное повышение чувствительности и специфичности ПЦР [Sakhabutdinova et al., 2020].

Положительное влияние энхансеров на ПЦР обусловлено разными причинами [Kurz, 2008]. Так, некоторые соединения (например, ДМСО, формамид, бетаин, эктоины) облегчают денатурацию цепей и снижают тем самым температуру плавления ДНК.

Другие добавки защищают полимеразу от стрессоров, таких как повторяющиеся циклы нагревания и охлаждения (трегалоза, эктоины), или стабилизируют нуклеиновые кислоты (детергенты, белки). Цвиттерионные соединения увеличивают диэлектрическую проницаемость раствора, что приводит к изменению в электростатическом окружении ДНК. Энхансеры с малыми размерами молекул (сульфоксиды, сульфоны, эктоины) оказывают также влияние на конформацию двойной спирали. В данной работе приведены предварительные результаты, свидетельствующие о положительном влиянии тяжелой воды на ПЦР-амплификацию "сложных" (GC-богатых) ДНК-мишеней.

Материалы и методы

В работе использованы следующие реактивы: 5-(этилтио)-1Н-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'-метиленисакриламид, Трис, персульфат аммония, динатриевая соль N,N,N',N'-этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (все AppliChem); Taq ДНК полимеразы (Fermentas), дезоксинуклеозидтрифосфаты (дНТФ) (СибЭнзим), SYBR Green I (Биотех-Индустрия). Для приготовления всех растворов использовали воду высшей категории качества (>18МОм) (Millipore).

В качестве ДНК-матрицы выступала тотальная ДНК богомола обыкновенного (*Mantis religiosa*), которую выделяли из мышечной ткани этого насекомого с помощью коммерческого набора «ДНК-Экстран-2» (Синтол) по протоколу производителя.

Олигонуклеотидные праймеры - прямые F1 (ccgaagatggtgaactatgcctgg), F2 (ccgttgattggggctctaaaggc), F3 (cgtgtgaaacataacgcaggagat) и обратные R1 (gtttcccctgactctgcctgg), R2 (ggtttagtggttcccagtgactgc), R3 (ggaacacgactctgaggacagc) подбирали на основе последовательностей нуклеотидов, депонированных в GenBank [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/] с использованием online-утилиты OligoAnalyzer

компания Integrated DNA Technologies [http://idtdna.com/]. 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, найденной при 260 нм, на спектрофотометре BioSpec-Mini (Shimadzu).

Полимеразную цепную реакцию в реальном времени проводили в ДНК-амплификаторе CFX96 Connect (Bio-Rad Laboratories). Реакционные смеси имели объем 20 мкл и содержали ДНК богomoла в количестве 3 нг, 1 мкл каждого из праймеров с концентрацией 1.0 О.Е./мл, 2.5 ед. акт. Таq ДНК полимеразы, 2.0 мкл смеси дНТФ с концентрацией 2.5 мМ, 2 мкл буфера для Таq ДНК полимеразы (67 мМ Трис-НСl (рН 8.8), 2.0 мМ MgCl₂, 18 мМ (NH₄)₂SO₄, 0.01% Твин-20) и 2 мкл 10× раствора SYBR Green I. Образцы, содержащие тяжелую воду, готовили путем добавления 4, 8, 10 или 12 мкл D₂O к остальным компонентам реакции. Каждый образец был представлен в трехкратном повторе. Использовали программу, рекомендуемую для ПЦР в режиме реального времени с применением интеркалирующих красителей: начальная денатурация при 94°C (3 мин), 40 и более циклов – денатурация при 94°C (15 с), отжиг при 59°C (40 с), элонгация при 72°C (30 с), конечная элонгация при 72°C (2 мин). Анализ результатов ПЦР дополнительно осуществляли с помощью гель-электрофореза в 10%-ном полиакриламидном геле в камере вертикального типа VE-10 (Хеликон) при напряжении 90-110 В с последующим окрашиванием бромистым этидием и визуализацией в приборе Gel Camera System (UVP Inc.).

Результаты и обсуждение

При постановке ПЦР весьма высок риск получения как ложноположительных, так и ложноотрицательных результатов, в отдельных случаях обусловленный протеканием неспецифической амплификации [Чемерис и др., 2012; Чемерис и др., 2012a]. Достоверность результатов зависит от ряда факторов, таких как качество репрепаратов ДНК и РНК, длина и GC-состав амплифицируемого фрагмента, качество праймеров, наличие ингибирующих веществ и пр. Для исключения неспецифической амплификации применяют так называемый «горячий старт» [Чемерис и др., 2011]. Одним из приемов повышения эффективности ПЦР является использование сближенных праймеров [Гарафутдинов и др., 2015; Garafutdinov et al., 2017]. Благодаря малой длине образующихся ампликонов для сближенных

праймеров отсутствует необходимость задания «традиционных» температур и продолжительности этапов отжига и денатурации. ПЦР со сближенными праймерами обеспечивает амплификацию ДНК в присутствии таких количеств ПЦР-ингибирующих агентов, при которых ПЦР с "традиционно" расположенными праймерами не протекает.

Повышения эффективности амплификации можно добиться также путем добавления в реакционные смеси некоторых веществ. Мы предположили, что одним из агентов, способных изменить протекание ПЦР, может служить дейтерированная вода (D₂O). Ранее было показано изменение конформации и стабильности белков в D₂O [Larsson, 1988; Makhatadze et al., 1995; Efimova et al., 2007; Korb et al., 2011] сведения о ее влиянии на реакции нуклеинового обмена в литературе отсутствуют. Тяжелая вода имеет более высокие значения соответствующих физических констант по сравнению с обычной водой (Табл. 1).

Таблица 1
Физические характеристики обычной (H₂O)
и тяжелой (D₂O) воды
Table 1 - Physical characteristics of water (H₂O)
and heavy water (D₂O)

Константа	H ₂ O	D ₂ O
Плотность, г/см ³	1	1.1042
Динамическая вязкость, Па*с	0.00101	0.00125
Температура плавления, °C	0	3.81
Температура кипения, °C	100	101.43
Теплоёмкость, Дж/(моль·К)	75.37	84.3

Мы предположили, что ввиду чуть более высокой плотности, вязкости и теплоемкости D₂O процессы тепло- и массопереноса в ходе ПЦР в тяжелой воде будут протекать иначе, чем в обычной. Для демонстрации влияния D₂O на ПЦР в качестве мишени для амплификации был выбран GC-богатый фрагмент высококопийного гена 28S рРНК богomoла обыкновенного (номер в Генбанке AY491212.1). Известно, что высокое содержание dG и dC в нуклеотидной последовательности существенно затрудняет протекание ПЦР за счет повышения температуры денатурации таких цепей ДНК [Green, Sambrook, 2019]. К амплифицируемым последовательностям ДНК были сконструированы и синтезированы 3 пары праймеров, обеспечивающих образование ампликонов размером 47 (праймеры F1 и R1), 166 (F2 и R2) и 352 п.о. (F3 и R3). Праймеры F1 и

R1 располагаются "встык" друг к другу, т.е. их 3'-концы отжигаются на смежных нуклеотидах комплементарных цепей ДНК. Такое расположение является крайним случаем сближения праймеров, и для подобных праймерных пар все преимущества системы сближенных праймеров проявляются наиболее ярко [Гарафутдинов и др., 2015].

ПЦР в реальном времени продемонстрировала влияние дейтерированной воды на ход реакции. В целом, оказалось, что это влияние становится заметным при относительно высоком содержании D₂O в реакционной смеси (>50%). При использовании максимально сближенных праймеров (F1/R1)

присутствие D₂O не приводило к изменению эффективности ПЦР, что объясняется, вероятно, малым размером ампликона и относительной легкостью его денатурации (рис. 1А, кривые 1 и 4). Наиболее ошутимое влияние D₂O наблюдалось в случае проведения ПЦР с парой праймеров F3/R3, дающих наибольший по размеру ампликон (рис. 1А, кривые 3 и 6). В этом случае наличие D₂O в реакционной смеси позволило существенно ускорить амплификацию, по-видимому, за счет повышения эффективности денатурации образующихся тугоплавких ампликонов.

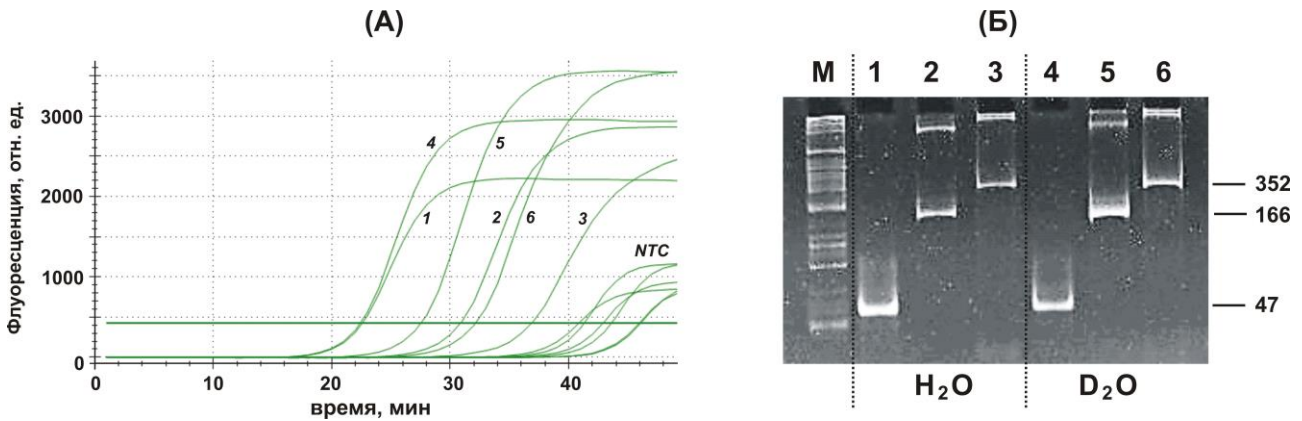


Рис.1. Влияние D₂O (содержание 60%) на амплификацию GC-богатых нуклеотидных последовательностей. (А) кривые амплификации и (Б) электрофореграмма результатов ПЦР: 1 и 4 - амплификация с праймерами F1/R1; 2 и 5 - с праймерами F2/R2; 3 и 6 - с праймерами F3/R3; 1, 2 и 3 - амплификация в присутствии H₂O; 4, 5 и 6 - амплификация в D₂O (60%); NTC - соответствующие отрицательные контроли (представлены данные только по одному образцу из каждого трехкратного повтора).

Fig.1. Effect of D₂O (60% content) on the amplification of GC-rich nucleotide sequences. (A) amplification curves and (B) electropherogram: 1 and 4 - amplification with F1/R1 primers; 2 and 5 - with F2/R2 primers; 3 and 6 - with F3/R3 primers; 1, 2 and 3 - amplification in the presence of H₂O; 4, 5 and 6 - amplification in D₂O (60%); NTC - non-template (negative) controls.

В случае использования праймеров с традиционным расположением (пары F2/R2 и F3/R3) ускорение реакции, что отражается в снижении величины порогового цикла C_t (Табл. 2). добавление тяжелой воды обеспечивает значимое

Таблица 2

Значения порогового цикла (C_t) при амплификации ДНК в присутствии D₂O (60%)
Table 2 - Threshold cycles (C_t) for DNA amplification in the presence of D₂O (60%)

	Primers					
	F1/R1		F2/R2		F3/R3	
	+ DNA	negative control	+ DNA	negative control	+ DNA	negative control
H ₂ O	22.1±0.2	46.0 ±0.3	31.4±0.2	45.9±0.2	35.8 ±0.4	43.2 ±0.5
D ₂ O	22.4±0.1	44.6 ±0.4	27.9 ±0.2	40.8±0.4	31.7 ±0.2	41.2 ±0.6

Значение ΔC_t для пары F2/R2 составило около 3.5 циклов, для пары F3/R3 - около 4 циклов. Смещение порогового цикла для образцов, содержащих D_2O , обеспечивает возможность получения более достоверных данных, поскольку позволяет с большей точностью дифференцировать специфическую и неспецифическую амплификацию за счет увеличения разницы в величинах C_t для опытных и контрольных образцов. Помимо ускорения реакции, D_2O обеспечивает повышение эффективности ПЦР (непосредственно процесса синтеза цепей ДНК), что выражается в характере подъема кривых амплификации: для ПЦР-образцов, содержащих тяжелую воду наблюдается более резкий подъем кривых. Кроме того, D_2O обеспечивает более высокий количественный выход продуктов реакции в случае амплификации более протяженных участков нуклеотидной последовательности (рис. 1Б).

Таким образом, впервые показана возможность использования тяжелой воды (D_2O) в качестве эффективного ПЦР-энхансера. Наибольший эффект данный агент оказывает при его содержании в количестве более 50% от объема ПЦР-смеси. Наибольшую эффективность D_2O проявляет при амплификации относительно протяженных GC-богатых нуклеотидных последовательностей, что свидетельствует о его влиянии на процесс денатурации ДНК, требующем дальнейшего более детального изучения.

Благодарности

Исследование выполнено в рамках государственного задания (№ АААА-А21-121011990119-1).

Литература

1. Гарафутдинов Р.Р., Галимова А.А., Сахабутдинова А.Р., Вахитов В.А., Чемерис А.В. ПЦР-амплификация ДНК с помощью праймеров "встык" // Мол. биол. 2015. Т. 49. № 4. С. 628-637. doi: 10.7868/S0026898415040059
2. Гарафутдинов Р.Р., Сахабутдинова А.Р., Чемерис А.В. Долговременное хранение молекул ДНК при комнатной температуре // Биомика. 2020. Т. 12. № 4. С. 552-563. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-49
3. 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-тетрагидропиримидина) и соли тетрагидропиримидиния на протекание полимеразной цепной реакции // Биомика. 2019. Т. 11. № 1. С. 14-22. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2019-03
4. Чемерис А.В., Магданов Э.Г., Гарафутдинов Р.Р., Вахитов В.А. Как исключить появление ложнопозитивных результатов при проведении полимеразной цепной реакции? // Вестн. биотехнол. физ.-хим. биол. 2012. Т. 8. № 3. С. 34-45.
5. Чемерис А.В., Чемерис Д.А., Магданов Э.Г., Гарафутдинов Р.Р., Нагаев Н.Р., Вахитов В.А. Причины ложно-негативной ПЦР и недопущение некоторых из них // Биомика. 2012. Т. 4. № 1. С. 31-47.
6. Чемерис Д.А., Магданов Э.Г., Машков О.И., Гарафутдинов Р.Р., Чемерис А.В. ПЦР с отложенным (горячим или задержанным) стартом // Биомика. 2011. Т. 2. № 1. С. 1-8.
7. Behlke M.A., Berghof-Jäger K., Brown T., et al. Polymerase Chain Reaction: Theory and Technology, Caister Academic Press, 2019.
8. 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
9. Chakrabarti R., Schutt C.E. Novel sulfoxides facilitate GC-rich template amplification // Biotechniques. 2002. V. 32. P. 866-874. doi: org/10.2144/02324rr04
10. Chakrabarti R., Schutt C.E. The enhancement of PCR amplification by low molecular-weight sulfones // Gene. 2001. V. 274. P. 293-298. doi: 10.1016/S0378-1119(01)00621-7
11. 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
12. Demeke T., Adams R.P. The effects of plant polysaccharides and buffer additives on PCR // Biotechniques. 1992. V. 12. P. 332-334.
13. Efimova Y.M., Haemers S., Wierczinski B., Norde W., van Well A.A. Stability of globular proteins in H_2O and D_2O // Biopolymers. 2007. V. 85(3). P. 264-273. doi: 10.1002/bip.20645
14. 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
15. Green M.R., Sambrook J. Polymerase Chain Reaction (PCR) Amplification of GC-Rich Templates, Cold Spring Harbour. Protoc. 2019. doi: 10.1101/pdb.prot095141
16. 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
17. <http://idtdna.com/>

18. https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A2%D1%8F%D0%B6%D1%91%D0%BB%D0%B0%D1%8F_%D0%B2%D0%BE%D0%B4%D0%B0

19. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

20. Korb J.P., Goddard Y., Pajski J., Diakova G., Bryant R.G. Extreme-values statistics and dynamics of water at protein interfaces // *J. Phys. Chem. B*. 2011. V. 115(44). P. 12845-12858. doi: 10.1021/jp2053426

21. 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.

22. Kurz M. Compatible solute influence on nucleic acids: many questions but few answers // *Saline Syst.* 2008. V. 4. 6. doi: 10.1186/1746-1448-4-6

23. Larsson U. Polymerization and gelation of fibrinogen in D₂O // *Eur. J. Biochem.* 1988. V. 174(1). P. 139-144. doi: 10.1111/j.1432-1033.1988.tb14073.x

24. Makhatadze G.I., Clore G.M., Gronenborn A.M. Solvent isotope effect and protein stability // *Nat. Struct. Biol.* 1995. V. 2(10). P. 852-855. doi: 10.1038/nsb1095-852

25. Meyer S., Schröter M.-A., Hahn M.B., Solomun T., Sturm H., Kunte H.J. Ectoine can enhance structural changes in DNA in vitro // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. 7170. doi: 10.1038/s41598-017-07441-z

26. 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

27. Sakhabutdinova A.R., Chemeris A.V., Garafutdinov R.R. Enhancement of PCR efficiency using mono- and disaccharides // *Anal. Biochem.* 2020. V. 606. 113858. doi: 10.1016/j.ab.2020.113858

28. 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

29. 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

30. 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.

31. Wilson I.G. Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification // *Appl. Environ. Microbiol.* 1997. V. 63. P. 3741-3751.

32. 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

1. Behlke M.A., Berghof-Jäger K., Brown T., et al. *Polymerase Chain Reaction: Theory and Technology*, Caister Academic Press, 2019.

2. 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

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

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

5. Chemeris A.V., Chemeris D.A., Magdanov E.G., Garafutdinov R.R., Nagaev N.R., Vakhitov V.A. Causes of false-negative PCR and prevention of some of them. *Biomics*. 2012. V. 4. No. 1. P. 31-47. (In Russian)

6. Chemeris A.V., Magdanov E.G., Garafutdinov R.R., Vakhitov V.A. How to exclude the appearance of false-positive results during the polymerase chain reaction? *Vestn. biotechnol. fiz.-chem. biol.* 2012. V. 8. No. 3. P. 34-45. (In Russian)

7. Chemeris D.A., Magdanov E.G., Mashkov O.I., Garafutdinov R.R., Chemeris A.V. PCR with delayed (hot or delayed) start. *Biomics*. 2011. V. 2. No. 1. P. 1-8. (In Russian)

8. 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

9. Demeke T., Adams R.P. The effects of plant polysaccharides and buffer additives on PCR. *Biotechniques*. 1992. V. 12. P. 332-334.

10. Efimova Y.M., Haemers S., Wierczinski B., Norde W., van Well A.A. Stability of globular proteins in H₂O and D₂O. *Biopolymers*. 2007. V. 85(3). P. 264-273. doi: 10.1002/bip.20645

11. Garafutdinov R.R., Galimova A.A., Sakhabutdinova A.R., Vakhitov V.A., Chemeris A.V. PCR amplification of DNA using abutting primers. *Mol. biol.* 2015. V. 49. No. 4. P. 560-568. doi: 10.1134/S0026893315040056

12. 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

13. Garafutdinov R.R., Sakhabutdinova A.R., Chemeris A.V. Long-term storage of DNA molecules at room temperature. *Biomics*. 2020. V. 12. No. 4. P. 552-563. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-49 (In Russian)

14. Green M.R., Sambrook J. *Polymerase Chain Reaction (PCR) Amplification of GC-Rich Templates*,

- Cold Spring Harbour Protoc.* 2019. doi: 10.1101/pdb.prot095141
15. 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
 16. <http://idtdna.com/>
 17. https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A2%D1%8F%D0%B6%D1%91%D0%BB%D0%B0%D1%8F_%D0%B2%D0%BE%D0%B4%D0%B0
 18. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
 19. Khasanova A.A., Kireeva D.R., Gibadullina N.N., Fazletdinova Z.N., Sakhabutdinova A.R., Garafutdinov R.R. Effect of hexahydropyrimidine derivatives, bis(1,2,3,4-tetrahydropyridine) and tetrahydropyrimidinium salts on the polymerase chain reaction. *Biomics.* 2019. V. 11. No. 1. P. 14-22. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2019-03 (In Russian)
 20. Korb J.P., Goddard Y., Pajski J., Diakova G., Bryant R.G. Extreme-values statistics and dynamics of water at protein interfaces. *J. Phys. Chem. B.* 2011. V. 115(44). P. 12845-12858. doi: 10.1021/jp2053426
 21. 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.
 22. Kurz M. Compatible solute influence on nucleic acids: many questions but few answers. *Saline Syst.* 2008. V. 4. 6. doi: 10.1186/1746-1448-4-6
 23. Larsson U. Polymerization and gelation of fibrinogen in D₂O. *Eur. J. Biochem.* 1988. V. 174(1). P. 139-144. doi: 10.1111/j.1432-1033.1988.tb14073.x
 24. Makhatadze G.I., Clore G.M., Gronenborn A.M. Solvent isotope effect and protein stability. *Nat. Struct. Biol.* 1995. V. 2(10). P. 852-855. doi: 10.1038/nsb1095-852
 25. Meyer S., Schröter M.-A., Hahn M.B., Solomun T., Sturm H., Kunte H.J. Ectoine can enhance structural changes in DNA in vitro. *Sci. Rep.* 2017. V. 7. 7170. doi: 10.1038/s41598-017-07441-z
 26. 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
 27. Sakhabutdinova A.R., Chemeris A.V., Garafutdinov R.R. Enhancement of PCR efficiency using mono- and disaccharides. *Anal. Biochem.* 2020. V. 606. 113858. doi: 10.1016/j.ab.2020.113858
 28. 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
 29. 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
 30. 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.
 31. Wilson I.G. Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997. V. 63. P. 3741-3751.
 32. 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: 10.2144/000113203.27