BIOMICS

ISSN 2221-6197 http://biomicsj.ru

Энхансеры ПЦР. III. Амплификация протяженных ДНК-матриц

[1]В.В. Зубов*, [2]А.Р. Сахабутдинова, [3]Д.А. Чемерис, [2]Р.Р. Гарафутдинов

[1]ООО «ИзоГель», Пущино, Московская область, Россия
[2]Институт биохимии и генетики Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия,
[3]ООО «ГЕНВЕД», Москва, Россия
*E-mail: genseq@mail.ru

Резюме

Периодически у экспериментаторов возникает необходимость наработки с помощью ПЦР довольно протяженных ампликонов, что не всегда удается осуществить в стандартных условиях. В таких случаях проводится так называемая "дальнобойная" ПЦР, особенностями которой являются увеличенное время этапа элонгации из расчета не менее 1 мин для 1 т.п.н. матрицы, смесь высокопроцессивной ДНК-полимеразы и ДНК-полимеразы с редактирующей активностью, позволяющей удалять неверно вставленные нуклеотиды, способные прервать дальнейшую полимеризацию, а также использование дополнительных компонентов в реакционной смеси, являющихся энхансерами ПЦР. В качестве таких энхансеров при амплификации протяженных матриц выступают различные вещества химической или биологической природы. Несмотря на то, что приоритеты для проведения "дальнобойной" ПЦР с течением времени несколько изменились в виду в первую очередь бурного развития высокопроизводительного секвенирования ДНК последних поколений и появления благодаря им возможности длинных и ультрадлинных прочтений, тем не менее, востребованность в амплификации протяженных фрагментов ДНК остается и даже расширяется спектр их применения, в том числе не только для биологических задач.

Ключевые слова: ПЦР, дальнобойная ПЦР, протяженные матрицы, энхансер

Цитирование: Зубов В.В., Сахабутдинова А.Р., Чемерис Д.А., Гарафутдинов Р.Р. Энхансеры ПЦР. III. Амплификация протяженных матриц. *Biomics*. 2025. 17(2). 170-181. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2025-13

© **Авторы,** В.В. Зубов, А.Р. Сахабутдинова, Д.А. Чемерис, Р.Р. Гарафутдинов, 2025

Enhancers of PCR. III. Amplification of long DNA templates

[1]V.V. Zubov*, [2]A.R. Sakhabutdinova, [3]D.A. Chemeris, [2]R.R. Garafutdinov

[1]IsoGel LLC, Pushchino, Moscow District, Russia
[2]Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia
[3]GENVED LLC, Moscow, Russia
*E-mail: genseq@mail.ru

Resume

Experimenters sometimes need to amplify fairly long DNA fragments using PCR, which is not always possible under standard conditions. In such cases, long-range PCR is performed, the features of which are an extended elongation stage time of at least 1 minute for 1 kb length of template, a mixture of highly

processive DNA polymerase and DNA polymerase with editing activity, allowing the removal of incorrectly inserted nucleotides capable of interrupting further polymerization, as well as the use of additional components in the reaction mixture, which are PCR enhancers. Various substances of chemical and biological nature act as such enhancers during the amplification of long DNA fragments. Despite the fact that the priorities for long-range PCR have changed somewhat over time, primarily due to the rapid development of high-throughput DNA sequencing of the latest generations and the possibility of long and ultra-long reads, nevertheless, the demand for amplification of long DNA fragments remains and even the range of their applications is expanding, including those beyond biological tasks.

Keywords: PCR, long-range PCR, long templates, enhancer

Citation: Zubov V.V., Sakhabutdinova A.R., Chemeris D.A., Garafutdinov R.R. Enhancers of PCR. III. Amplification of long templates. *Biomics*. 2025. 17(2). 170-181. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2025-13 (In Russian)

© The Authors, V.V. Zubov, A.R. Sakhabutdinova, D.A. Chemeris, R.R. Garafutdinov, 2025

Введение

Начать нужно с того, что амплификация длинных, или протяженных матриц с помощью ПЦР в англоязычной литературе имеет целый ряд названий как то: Long PCR, LA-PCR (**L**ong and **A**ccurate), XL PCR (E**X**tra **L**ong), Long distance PCR, Long template PCR, Long-range PCR. При этом в разные годы популярными были те или иные обозначения этой реакции, а некоторые использовались крайне редко. На русском нет устойчивого названия этого варианта ПЦР, хотя иногда используется определение «протяженная» (long), но с учетом того, что в последние годы наиболее употребляемым в мире является словосочетание long-range PCR, то вполне уместно будет называть такую амплификацию «дальнобойной ПЦР», что в общем и целом соответствует происходящим в ней процессам. Причем, как и в артиллерии, «дальнобойность» ПЦР определяется разными обстоятельствами и может быть весьма разной, что станет видно из изложенного ниже материала. И зависит она от многих факторов различной природы, включая саму ДНК как мишень и матрицу; качество подобранных праймеров; подходящую ДНК полимеразу либо смеси разных; привносимые вместе с амплифицируемой ДНК разные ингибирующие примеси и как противовес им специально добавляемые в реакцию различные соединения, выступающие энхансерами такой ПЦР, а также время протекания ПЦР, и в первую очередь продолжительность этапа элонгации. Словом, все в дальнобойной ПЦР каждый раз очень индивидуально даже для одинаковых мишеней из разных образцов, которые могут отличаться, как количеством самой ДНК (копий мишени), так и загрязнениями, ко-экстрагируемыми с ней.

С учетом того, что подавляющее большинство проводимых с помощью ПЦР амплификаций ведут к наработке ампликонов размерами от 100 до 3000 п.н., то превышение мишеней в длину для верхней границы уже можно до некоторой степени считать длинными матрицами. И периодически необходимость амплификации протяженных фрагментов ДНК у экспериментаторов возникает. Впрочем, очень часто ампликоны с относительно небольшим превышением указанного размера образуются и без добавления каких-либо энхансеров, если ведется работа с ДНК с обычным GC-составом, не выше 60%, поскольку таковые уже считаются GC-богатыми и их амплификация требует особого внимания чему посвящена отдельная статья этого номера журнала [Гарафутдинов и др. (Garafutdinov et al.), 2025]. Однако усиление амплификации может требоваться, когда даже обычная мишень имеет длину 6-10 т.п.н. и более.

В данном обзоре акцент будет сделан преимущественно на оригинальных статьях методического плана или пионерных работах, рассматриваемых по возможности в хронологическом порядке для воссоздания объективной картины развития этой технологии и фундаментальных исследований на ее основе. При этом за прошедшие десятилетия цели амплификации протяженных матриц претерпели значительные изменения и ранее использовавшиеся подходы из-за изменения стоящих задач отчасти потеряли свою актуальность благодаря общему развитию методов молекулярной биологии и в особенности секвенирования ДНК новых поколений. Тем не менее, некоторых из них при проведении дальнобойной ПЦР кратко коснемся, поскольку нельзя исключать, что кое-что из забытого старого может оказаться полезным в будущем или уже в настоящее время на современном уровне технологического развития.

Учитывая важность проведения ПЦР для амплификации протяженных фрагментов ДНК, очень многими фирмами, производящими реагенты для

молекулярной биологии, выпускаются соответствующие наборы, главные отличия которых заключаются в используемых в них ферментах в виде смесей разных термостабильных ДНК полимераз, а также отличающихся компонентов буферов. При этом детальное рассмотрение особенностей ДНК полимераз, используемых при амплификации протяженных матриц, явится темой другой статьи.

В литературе можно встретить немало обзорных публикаций по дальнобойной ПЦР [Foord, Rose, 1994; Karunanathie et al., 2022], а также конкретных протоколов ее проведения [Cheng, Kolmodin, 1997; Waggott, 1998; Davies, Gray, 2002; Chua et al., 2017; Green, Sambrook, 2019; Kee et al., 2023] однако значительная их часть была подготовлена достаточно давно.

Общие замечания

Как известно диаметр двойной спирали составляет около 2 нм, а один виток спирали, формируемый 10,5 нуклеотидами имеет длину 3,4 нм. Следовательно, ДНК представляет собой молекулу с огромным соотношением длины к толщине и для фрагмента ДНК, например, размером 10 т.п.н. оно составит приблизительно 1500:1. Для ДНК фага лямбда, включая клонированные фрагменты в векторах на его основе с их общими размерами около 50 т.п.н., такое соотношение будет уже около 7500:1. Однако с учетом того, что, по сути, ДНК фага лямбда - это отдельные молекулы фиксированного размера, то их удается относительно легко выделять в интактном виде и поэтому во многих случаях при амплификации длинных матриц, как будет видно из дальнейшего изложения именно они и служили исходным материалом.

Что касается свободноживущих организмов, то размеры их ДНК в виде отдельных молекул достигают у прокариот ≈10 млн.п.н. преимущественно в кольцевой форме, тогда как у эукариот в составе хромосом линейная длина ДНК может превышать миллиард п.н., и тем самым соотношения длины к толщине у этих групп организмов будут около 1500000:1 и 150000000:1 соответственно. В частности, растение *Paris japonica* имеет самый большой (из известных) геном, размер которого в виде C-value оценен в 150 млрд.п.н.; при этом он распределен по 40 хромосомам и это означает что для некоторых молекул ДНК в составе хромосом (их размер в нуклеотидах у этого вида неизвестен) такое соотношение может достичь и 10^9:1 и даже больше.

Несмотря на то, что двухцепочечная ДНК довольно прочная молекула из-за такого гигантского соотношения длины к толщине она при обращении с ней *in vitro* не выдерживает механических нагрузок и в первую очередь гидродинамических воздействий, ломаясь в произвольных местах, и позволяя обычно выделять препараты ДНК с размерами, редко превышающими 50 т.п.н. При этом существует немало способов выделения и фракционирования высокомолекулярной ДНК, но им посвящена отдельная статья [Зубов, Чемерис (Zubov, Chemeris), 2025] и этих вопросов здесь касаться не будем. Хотя стоит упомянуть одну работу, в которой как раз поднимался вопрос о достаточности размера используемой для амплификации ДНК при проведении дальнобойной ПЦР, и сравнивалось несколько методов выделения этого биополимера [Cheng et al., 1995].

Все вышесказанное означает, что если возникает необходимость амплифицировать протяженный участок ДНК, то препарат, содержащий такую мишень, должен иметь даже заметно бóльшую длину нежели сама мишень, поскольку вероятность того, что разрывы двойной спирали произойдут во многих мишенях на участке между местами отжига праймеров согласно теории вероятности существует. Таким образом, чем меньше максимальный размер выделенной ДНК превышает ожидаемый размер ампликона, тем большее количество исходной ДНК должно быть взято в реакцию, чтобы повысить шансы иметь цельную мишень, пригодную для амплификации. В случае, если в исходном препарате ДНК не будет вообще матриц такого размера как ожидаемый ампликон, то никакие улучшения проведения ПЦР в виде разных ухищрений, которые будут обсуждаться дальше, не помогут его получить.

Однако и при наличии ДНК достаточного размера амплификация протяженных матриц не всегда может быть успешной. И причин тому немало. Прежде всего, нужно иметь ввиду скорость работы той или иной термостабильной ДНК полимеразы и соответственно устанавливать время этапа элонгации с таким расчетом, чтобы фермент определенно успел достроить новую цепь нужной длины. Обычно следует исходить из расчета 1 мин элонгации на 1 т.п.н., хотя можно встретить рекомендации в виде двух минут для построения цепи ДНК такой длины. Из-за более продолжительного этапа элонгации общее время реакции заметно возрастает и ДНК полимераза может частично терять свою активность в связи с чем рекомендуется для дальнобойной ПЦР брать несколько увеличенное количество фермента или ферментов, поскольку наиболее оптимальные результаты достигаются при использовании ДНК полимеразы с высокой процессивностью вкупе с ДНК полимеразой, обладающей редактирующей активностью, в виде мажорного и минорного компонента такой ферментной системы, соответственно. При этом существуют некоторые

соединения пролонгирующие работу термостабильных ДНК полимераз, выступающих энхансерами подобных вариантов ПЦР и о них подробно говорилось в предыдущей статье [Гарафутдинов и др. (Garafutdinov et al.), 2025]. Также большое значение имеет GC-состав амплифицируемых участков и если он GC-богатый, то это накладывает дополнительные трудности, подробно рассмотренные в последующей статье [Гарафутдинов и др. (Garafutdinov et al.), 2025a].

В одной из работ обращается внимание на то, что реакционные пробирки не всех производителей одинаково хорошо подходят для проведения дальнобойной ПЦР и приводятся результаты амплификации фрагментов ДНК размерами 3.5, 6.6. и 15 т.п.н. с помощью KAPA Long Rang HotStart DNA polymerase со временем этапа элонгации 13 мин, из которых видно, что самый крупный ампликон нарабатывался только в пробирках одного производителя [Chua et al., 2015]. И такие нюансы при проведении дальнобойной ПЦР тоже следует иметь в виду при очевидных неуспехах, не находящих объективных объяснений.

Амплификация протяженных матриц с помощью ПЦР за счет увеличенной продолжительности этапа элонгации и комбинации различных термостабильных ДНК полимераз

Первой статьей, в которой сообщалось об амплификации длинных матриц стала работа А.Джеффриса и его коллег [Jeffreys et al., 1988], где они использовали ПЦР[1] для выявления минисателлитных последовательностей или иначе VNTR-локусов (Variable Number of Tandem Repeats) для целей ДНК-идентификации личности о чем подробно говорится в книге «ДНК-криминалистика» [Чемерис и др. (Chemeris et al.), 2022]. Используя ДНК, выделенную из единичных клеток, тем авторам удалось амплифицировать несколько VNTR-локусов с размерами до 17,9 т.п.н., однако отчасти из-за относительно небольшого числа проводимых ПЦР циклов (от 10 до 20) ампликоны были не видны на гель-электрофорезе и для их выявления пришлось прибегнуть к блот-гибридизации по Саузерну и регистрировать радиоактивные сигналы на мембранных фильтрах путем радиоавтографии. Так, для амплификации фрагмента ДНК длиной 2.9 т.п.н. оказалось достаточным элонгации продолжительностью 6 мин, но для ампликонов большего размера (10.2 и 17.9 т.п.н.) авторы увеличили ее до 30 мин, хотя в последующих экспериментах ограничились 15 мин. При этом было обращено внимание на то, что добавление новой порции Taq полимеразы после 13 цикла не приводило к резкому усилению наработки целевых продуктов, из чего был сделан вывод, что фермент выдерживает столь длительное пребывание при высоких температурах на разных этапах в виде 1 мин при 95°C (денатурация), 1 мин при 60°C (отжиг) и 15 мин при 70°C (элонгация), повторяющихся в их работе в течение 10 – 20 циклов.

Здесь стоит еще заметить, что цитируемая статья [Jeffreys et al., 1988] уникальна еще и тем, что в ней была описана одновременная детекция сразу шести VNTR-локусов, к тому же часть из них были довольно крупного размера, причем данная работа оказалось одной из первых публикаций по мультиплексной ПЦР, рассмотренной нами ранее [Зубов и др. (Zubov et al.), 2024].

При оптимизации температур отжига большого числа праймеров велась амплификация разных участков ДНК фага лямбда, среди которых был и довольно протяженный размером 10881 п.н. [Rychlik et al., 1990]. В качестве фермента использовалась Taq полимераза и было обнаружено, что при этапе элонгации, продолжавшимся 10 мин, данный ампликон не нарабатывался, тогда как при увеличении времени до 20 и 30 мин на гель-электрофорезе появилась ясно видимая полоса, причем лучшие результаты обеспечивал отжиг подобранных праймеров при температуре 57°C, тогда как при температурах выше и ниже эффективность амплификации ухудшалась или даже практически отсутствовала.

В следующем году вышла только одна работа, в которой говорилось об успешной амплификации с помощью разных термостабильных ДНК полимераз клонированных в фаге лямбда протяженных фрагментов ДНК с размерами 6 т.п.н. (AmpliTaq, Hot Tub, Vent), 9 т.п.н. (Hot Tub), 10 т.п.н. (AmpliTaq) и 12 т.п.н. (Vent), при этом этап элонгации продолжался от 5 до 7 мин [Krishnan et al., 1991].

Годом позже было опубликовано сразу несколько статей, в которых сообщалось об амплификации крупных фрагментов ДНК. Так, был амплифицирован участок клонированной ДНК длиной 9.0 т.п.н. с помощью Hot Tub полимеразы, обеспечиваемый 10 минутным временем элонгации [Maga, Richardson, 1992]. В еще одной работе для амплификации фрагмента ДНК размером 10.2 т.п.н. были опробованы несколько ДНК полимераз и только с Tub полимеразой нарабатывался целевой продукт с оптимумом элонгации по времени 8 мин [Kainz et al.,

[1] Это была к тому же одна из первых работ по ПЦР с применением термостабильной Taq полимеразы, но словосочетание ‘long PCR’ и им подобные в ней не использовались, хотя прилагательное ‘long’ упоминалось несколько раз в виде ‘long alleles’ или ‘long minisatellite alleles’.

1992]. 5 минутной элонгации при 72°C хватило другим авторам для амплификации фрагмента длиной 6.2 т.п.н. Taq полимеразой [Ponce, Micol, 1992].

В 1994 г. было сообщено об успешной амплификации фрагментов ДНК длиной до 6 т.п.н. с помощью Tfl полимеразы с увеличенным временем элонгации до 5 мин [Grujic et al., 1994]. В том же году одна из статей была посвящена амплификации целого ряда фрагментов ДНК фага лямбда размерами от 5.8 до 35 т.п.н., чего удалось достичь благодаря увеличенному времени элонгации, варьирующему для разных матриц от 11 до 24 мин, и смеси двух термостабильных ДНК полимераз Klentag1 и Pfu[2], представленных в соотношении 15/16 и 1/16 соответственно [Barnes, 1994]. Весьма важным оказалось именно использование смеси двух полимераз с высокой процессивностью (Klentag1) и с редактирующей 3'→5' экзонуклеазной активностью (Pfu) в виде мажорного и минорного компонентов их смеси соответственно, что позволило строить протяженные цепи ДНК и при этом удалять неверно вставленные нуклеотиды, потенциально способные прерывать дальнейшую полимеризацию. Как уже говорилось выше, такой подход оказался очень удачным и многими фирмами затем стали производиться специальные наборы для амплификации длинных матриц со своими смесями подобных ферментов.

В одной из работ при амплификации протяженного фрагмента ДНК снежной полевки был применен touch-down вариант ПЦР, при котором в 14 первых циклах производилось снижение температуры отжига в каждом на 0.2°C, но при этом увеличивалось время элонгации с 10 мин в первом цикле на 20 сек в каждых последующих циклах, что позволило наработать целевой продукт длиной 12.4 т.п.н. [Wandeler, Camenisch, 2011].

Дальнобойная ПЦР с помощью различных энхансеров

Пожалуй, первой публикацией о применении энхансеров в ПЦР для амплификации длинных матриц стало краткое сообщение, описывающее присутствие в реакционной смеси 0.5-1 нмоль gp32 белка фага T4, что способствовало амплификации двух фрагментов ДНК длиной 3 и 6.5 т.п.н., при этом детекция второго из них оказалась возможной только после блот-гибридизации после 30 циклов ПЦР с помощью Taq полимеразы со временем элонгации, составившим 5 мин [Schwarz et al., 1990].

При работе с отдельными изолятами в виде несущих идентичные вставки фаговыми клонами для амплификации фрагментов ДНК длиной от 3.5 до 9.0 т.п.н., генерируемых с помощью транспозона Tn5supF с введением сайтов для отжига праймеров случайным образом, в реакционную смесь добавлялся оказывающий положительный эффект желатин в оптимальной концентрации 0.01% [Ohler, Rose, 1992]. При этом добавление слабого детергента Tween 20 заметного влияния на эффективность ПЦР не оказало. Также теми авторами проводилась оптимизация разных параметров ПЦР, включающая горячий старт в ручном режиме[3], особые условия термоциклирования, а также применение целого ряда термостабильных ДНК полимераз, характеризующихся наличием или отсутствием 5'→3' и 3'→5' экзонуклеазных активностей, среди которых наиболее подходящим оказался рекомбинантный фермент rTth полимераза.

В 1994 г. было сообщено об амплификации большого числа вставок геномных последовательностей человека в векторах на основе фага лямбда размерами от 22.8 до 39 т.п.н., а также об анализе фрагментов ДНК, выделяемых из фаговых бляшек размерами от 9 до 23 т.п.н., с помощью целого ряда термостабильных ДНК-полимераз и их комбинаций в присутствии энхансеров, которыми служили 1-5% ДМСО (диметилсульфоксид) и 6-8% глицерин [Cheng et al., 1994; 1994a]. Наилучшие результаты амплификации длинных матриц были достигнуты комбинацией в реакционной смеси 0.015 – 0.15 единиц активности Vent полимеразы и 2 – 2.25 единиц активности rTth полимеразы. Что касается времени элонгации, то оно начиналось с 10 – 12 минут и доходило до 16 – 22 мин, увеличиваясь с каждым циклом на 15 – 20 сек. Общее время реакции составляло от 6 до 10 час в зависимости от ожидаемых размеров ампликонов и соответственно условий термоциклирования. В своей другой работе эти авторы, подобрав праймеры к высоко консервативным участкам гена цитохрома *b*, сумели амплифицировать почти полную митохондриальную ДНК человека длиной 16.3 т.п.н., используя те же энхансеры ПЦР (10% глицерин и 2-2.25% ДМСО) и смесь ДНК полимераз в виде 1 единицы активности rTth полимеразы и 0.03-0.06 единицы активности Vent полимеразы [Cheng et al., 1994b].

Смесь нескольких соединений в виде 5% глицерина, 10 мМ дитиотрейтола и 1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина послужила энхансером для амплификации фрагмента ДНК фага лямбда длиной 20,707 п.н., но для этого также потребовалось присутствие ДНК полимеразы с редактирующей активностью [Nagai et al., 1998].

[2] в этой работе испытывался и целый ряд других сочетаний ДНК-полимераз

[3] Способов проведения ПЦР с горячим или отложенным стартом существует немало разных и им посвященная другая статья [Чемерис и др., 2011].

Добавление в реакционную смесь экзонуклеазы III – основного репарирующего фермента бактерий позволило улучшить дальнобойную ПЦР при амплификации поврежденных матриц и получить целевые продукты ядерного и митохондриального геномов размерами от 5 до 15.4 т.п.н. с использованием rTth полимеразы одной или в смеси с Vent полимеразой, либо Taq полимеразы вместе с Pwo полимеразой [Fromenty et al., 2000]. При этом время элонгации в зависимости от длины матриц составляло от 7.5 до 20 мин.

Было показано, что присутствие в реакционной смеси с Pfu полимеразой фермента dUPTase из того же вида археи *Pyrococcus furiosus*, приводит к превращению образующегося в ходе ПЦР dUTP из-за дезаминирования dCTP в dUMP и PPi, исключая тем самым включение дезоксиурацилов в строящуюся цепь ДНК и соответственно не вызывая ингибирования процесса полимеризации, что способствует амплификации протяженных матрац до 14 т.п.н. [Hogrefe et al., 2002].

Описана амплификация целого ряда матриц на основе фага лямбда размерами от 3.5 до 24 т.п.н. с помощью обычной Taq полимеразы благодаря специальному буферу с энхансерами ПЦР в виде 4% глицерина и 0.5% ДМСО [Lee et al., 2007]. Праймеры имели большую длину (40 звеньев) и температуру отжига 68°C, что позволило осуществлять двухстадийную ПЦР. При этом время этапа отжига/элонгации составляло от 3.5 до 24 мин в зависимости от длины матрицы.

Отечественными авторами было обнаружено, что присутствие в реакционной смеси в виде неактивных в отсутствие кофактора NAD белков термостабильных Taq и Tth лигаз тем не менее оказывает положительный эффект при амплификации протяженных матриц в ходе ПЦР с использованием смесей разных ДНК полимераз на примере наработки ампликонов размерами 10, 15 и 20 т.п.н. с продолжительностью этапа элонгации 8 – 10 мин [Игнатов, Крамаров (Ignatov, Kramarov), 2009].

В развитии подхода по исключению встраивания в строящуюся цепь дезоксиурацилов в ходе дальнобойной ПЦР для амплификации геномной ДНК размером до 23 т.п.н. был использован химерный фермент Herculase II, представляющий собой Pfu полимеразу, сшитую с ДНК-связывающим белком и dUPTase [Hogrefe, Borns, 2011]. За счет увеличенной процессивности данного химерного фермента (185 нуклеотидов против 15 и 42 нуклеотидов для нативной Pfu и Taq полимераз соответственно) приблизительно в два раза сокращается время ПЦР. В качестве энхансера использовался ДМСО в 3 – 6%-ных концентрациях в зависимости от длины мишени. Причем авторы обращают внимание, что для наработки ампликонов размером 23 т.п.н. исходная ДНК должны быть высокомолекулярной - <50 т.п.н.

Другими отечественными авторами для улучшения дальнобойной ПЦР предложено добавлять в реакционную смесь с Taq полимеразой дополнительный белок в виде ДНК-связывающего домена ДНК лигазы *P.abyssi*, который был ими клонирован в экспрессионных векторах, что позволило улучшить наработку ампликона длиной 8.2 т.п.н. (время этапа элонгации составило 4 мин), преодолевая к тому же ингибирующее действие гепарина [Oscorbin et al., 2015].

Несколько позже был создан химерный фермент из Stoffel фрагмента Taq полимеразы и ДНК-связывающего домена термостабильной ДНК лигазы *P.furiosus* путем их слияния генно-инженерным путем, что придало новому ферменту ряд ценных свойств, включая улучшенную способность для дальнобойной ПЦР, продемонстрированную при амплификации фрагментов ДНК длиной 8 и 10 т.п.н., а также ставшему нечувствительным к ингибиторам в виде гепарина и лактоферрина [Śpibida et al., 2018].

В одной работе было показано, что клонированные компоненты холоэнзима ДНК полимеразы III из *Thermus thermophilus*, формирующие репликативный комплекс, обладают более высокой скоростью полимеризации равной 350 нуклеотидов в секунду и за более короткое время позволяют наработать в ПЦР фрагменты ДНК фага лямбда длиной до 15 т.п.н. [Ribble et al., 2015]. Благодаря увеличенной скорости полимеризации нет нужды в продолжительном этапе элонгации, из-за которого дальнобойная ПЦР с обычным ферментом или с их смесью продолжается до 15 час. В этой работе для поиска энханесров амплификации с целью повышения термостабильности всех белков было перепробовано 59 различных соединений разной природы и составлен оптимальный буфер, содержащий дополнительные ингредиенты в виде 15% глицерина, 10% сорбитола (или 15% мальтитола), 1% ПЭГ 20000, 1 М хлорида триметиламмония.

Некоторые применения дальнобойной ПЦР

Как уже отмечалось выше, стоящие перед экспериментаторами задачи по применению дальнобойной ПЦР менялись со временем, что в первую очередь вызвано развитием технологий полногеномного высокопроизводительного секвенирования, в том числе благодаря чтению длинных и ультрадлинных фрагментов ДНК.

В одной из старых работ было продемонстрировано, что наработка протяженных ампликонов с помощью дальнобойной ПЦР позволяет

легко проводить их рестриктазное картирование [Her, Weinshilboum, 1995]. Позже этими же авторами показано, что при амплификации длинных фрагментов ДНК трех близкородственных генов фенолсульфотрансфераз, когда было необходимо исключить из амплификации часть из них для такой избирательной амплификации производилось расщепление тотальной ДНК соответствующими ферментами, пользуясь тем, что внутри некоторых последовательностей имелись сайты узнавания рестрикционных эндонуклеаз, отсутствующих в области мишени целевого гена [Her, Weinshilboum, 1996]. Более подробно все эти результаты были изложены в их другой работе [Her, Weinshilboum, 1999]. Несколько иной вариант рестриктазного картирования, сопряженного с дальнобойной ПЦР, описали другие авторы, назвав свой вариант еще и оптической ПЦР [Skiadas et al., 1999].

Нашла применение дальнобойная ПЦР и для гаплотипирования, в том числе в виде аллель-специфичной ПЦР при амплификации матриц длиной 9.5 т.п.н. [Michalatos-Beloin et al., 1996] и 19 т.п.н. [Nagano et al., 2003].

Описан довольно сложный вариант супрессионной субтрактивной гибридизации с трейсером и драйвером с использованием дальнобойной ПЦР с участием специальных адапторов, направленный на выявление инделов и прочих перестроек геномов близкородственных видов бактерий [Tsoktouridis et al., 2005]. Однако этот способ был разработан еще до появления методов секвенирования новых поколений[4], благодаря которым сейчас подобные различия проще и главное точнее выявлять секвенированием их полных геномов, не говоря уже от таргетном секвенировании.

В ДНК-нанотехнологиях, основу которых заложил уже довольно давно американский исследователь N.Seeman [1982], важное значение имеет создание особых конструкций, сборка которых возможна благодаря двухцепочечной структуре молекул ДНК и принципу комплементарности. Одними из таких конструкций являются ДНК-оригами, формируемые множественными относительно короткими цепями ДНК, выполняющими роль скреп и находящими себе комплементарные участки на некой матрице, который обычно служит одноцепочечный фаг M13, но его размер относительно невелик (хотя и не мал) и равен приблизительно 7 т.н. Для создания увеличенного ДНК-оригами с линейными размерами 108 × 238 нм с помощью дальнобойной ПЦР был получен одноцепочечный участок ДНК фага лямбда размером 26,182 п.н., выступающий в качестве некоего каркаса, который превращался в оригами за счет его расщепления ферментом EcoRI на три фрагмента разной длины и отжига на них 792 олигонуклеотидов длиной по 32 звена каждый [Zhang et al., 2012]. Для этого у двухцепочечного ампликона размером 26 т.п.н. после дальнобойной ПЦР под действием экзонуклеазы лямбда с 5’-конца удалялась одна цепь, тогда как у второй комплементарной цепи ее 5’-конец был защищен от ферментативного разрушения особой группой.

С помощью дальнобойной ПЦР с количественной оценкой результатов было предложено контролировать степень разрушения аденовируса под действием разных доз ультрафиолетового облучения [Rodriguz et al., 2013]. Для этого после соответствующих обработок проводилась амплификации фрагментов аденовирусной ДНК размерами 1, 6 и 10 т.п.н., что позволяло в тот же день оценить эффективность подобной дезинфекции, тогда как с помощью культуры клеток на это уходило более 7 дней.

Выше уже упоминалось об амплификации почти полного митохондриального генома человека с помощью дальнобойной ПЦР [Cheng et al., 1994b]. Не так давно было показано, что аналогичным образом можно амплифицировать почти полный митохондриальный геном костистых рыб как в ходе модельных экспериментов, так и из выделенной ДНК из окружающей среды (воды) [Deiner et al., 2017]. При этом пара праймеров была подобрана так, что не амплифицировался лишь участок длиной 43 п.н., тогда как остальной митогеном размером 16 – 17 т.п.н. был наработан у более чем трех десятков видов рыб, затем секвенирован и собран *de novo*, что, в том числе свидетельствует в целом о довольно неплохой сохранности ДНК в окружающей среде.

Для установления таксономического положения актиноризных микроорганизмов без их культивирования были подобраны праймеры к консервативным участкам фрагмента генома длиной около 32 т.п.н., что позволило после его амплификации с помощью дальнобойной ПЦР провести таргетное секвенирование и сравнить результаты с аналогичным участком их сородичей из рода *Frankia* [Flandrois et al., 2019].

В целом ряде статей дальнобойная ПЦР используется для подготовки препаратов ДНК к мономолекулярному секвенированию с помощью SMRT метода [Mareso et al., 2023] или нанопоровой технологией [McClinton et al., 2023; Quan et al., 2023; Alayed et al., 2025]. Для секвенирования изолятов нового коронавируса SARS-CoV-2 с помощью

[4] рукопись той статьи была получена редакцией в феврале 2004 г., а первая публикация по NGS секвенированию вышла в 2005 г. [Margulies et al., 2005]

нанопоровой технологии предложено использовать дальнобойную ПЦР с ограниченным числом праймеров (7 пар) и средним размером ампликонов около 4.5 т.п.н. вместо применяющихся комплектов праймеров ARTIC (98 пар праймеров, средний размер 400 п.н.) и Midnight (29 пар, средний размер 1200 п.н.) [Kandel et al., 2024]. Здесь можно лишь напомнить, что длина РНК-генома SARS-CoV-2 составляет около 29900 нуклеотидов.

Заключение

Как можно видеть из изложенного выше, востребованность дальнобойной ПЦР хотя и сменила свои приоритеты тем не менее не сильно снизилась, несмотря на появление высокопроизводительных методов секвенирования ДНК новых поколений, позволяющих относительно легко секвенировать полные геномы организмов разных уровней генетической сложности. Сейчас, в частности, с помощью такого варианта ПЦР готовятся образцы для таргетного секвенирования мономолекулярными методами, с помощью которых производятся длинные и ультрадлинные прочтения. Находит применение амплификация протяженных матриц и для иных целей в виде, например, оценки степени эффективности противовирусной дезинфекции, а также для ДНК-нанотехнологий. Можно допустить, что с дальнейшим ростом производительности и достоверности секвенирования ДНК роль дальнобойной ПЦР в качестве пробоподготовки для таких исследований будет снижаться, но возможно будет увеличиваться небиологическое применение этого варианта ПЦР. При этом еще далеко не все возможности по повышению производительности этой реакции исчерпаны. Это касается и усовершенствования ДНК полимераз и расширение спектра различных энхансеров процесса амплификации.

Литература

1. Гарафутдинов Р.Р., Чемерис Д.А., Сахабутдинова А.Р. Энхансеры ПЦР. II. Химические и биологические вещества. *Biomics*. 2025. 17(2). 157-169. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2025-12
2. Гарафутдинов Р.Р., Сахабутдинова А.Р., Чемерис Д.А. и др. Энхансеры ПЦР. IV. Амплификация GC-богатых матриц. *Biomics*. 2025a. 17(2). 182-192. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2025-14
3. Зубов В.В., Сахабутдинова А.Р., Чемерис Д.А. и др. Варианты ПЦР с более чем двумя праймерами. II. Принцип и особенности мультиплексной ПЦР. *Biomics*. 2024. 16(2). 234-243. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2024-14
4. Зубов В.В. Чемерис Д.А. Простое фракционирование молекул ДНК по размеру путем их осаждения. *Biomics*. 2025. 17(2). 139-156. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2025-11
5. Игнатов К.Б., Крамаров В.М. ДНК-лигазы термофильных бактерий повышают эффективность ПЦР-амплификации длинных последовательностей ДНК. *Биохимия*. 2009. 74(5). 685-690.
6. Чемерис А.В., Аминев Ф.Г., Гарафутдинов Р.Р. и др. ДНК-криминалистика. М.: Наука. 2022. 466 С.
7. Чемерис Д.А., Магданов Э.Г., Машков О.И. и др. ПЦР с отложенным (горячим или задержанным) стартом. *Biomics*. 2011. 2(1). 1-8.
8. Alayed B, Siddiqui S, Anand S et al. Long-Range PCR and Nanopore Sequencing Enables High-Throughput Detection of TCF4 Trinucleotide Repeat Expansions in Fuchs Endothelial Corneal Dystrophy. *Mol Diagn Ther*. 2025. doi: 10.1007/s40291-025-00803-8
9. Barnes WM. PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from lambda bacteriophage templates. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994. 91(6). 2216-2220. doi: 10.1073/pnas.91.6.2216
10. Cheng S, Chang SY, Gravitt P et al. Long PCR. *Nature*. 1994. 369(6482). 684-685. doi: 10.1038/369684a0
11. Cheng S, Chen Y, Monforte JA et al. Template integrity is essential for PCR amplification of 20- to 30-kb sequences from genomic DNA. *PCR Methods Appl.* 1995. 4(5). 294-298. doi: 10.1101/gr.4.5.294
12. Cheng S, Fockler C, Barnes WM et al. Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994a. 91(12). 5695-5699. doi: 10.1073/pnas.91.12.5695
13. Cheng S, Higuchi R, Stoneking M. Complete mitochondrial genome amplification. *Nat Genet*. 1994b. 7(3). 350-351. doi: 10.1038/ng0794-350
14. Cheng S, Kolmodin LA. XL PCR amplification of long targets from genomic DNA. *Methods Mol Biol.* 1997. 67. 17-29. doi: 10.1385/0-89603-483-6:17
15. Chua EW, Maggo S, Kennedy MA. Long Fragment Polymerase Chain Reaction. *Methods Mol Biol*. 2017. 1620. 65-74. doi: 10.1007/978-1-4939-7060-5_3
16. Chua EW, Miller AL, Kennedy MA. Choice of PCR microtube can impact on the success of long-range PCRs. *Anal Biochem*. 2015. 477. 115-117. doi: 10.1016/j.ab.2015.02.023
17. Davies PA, Gray G. Long-range PCR. *Methods Mol Biol*. 2002. 187. 51-55. doi: 10.1385/1-59259-273-2:051
18. Deiner K, Renshaw MA, Li Y et al. Long-range PCR allows sequencing of mitochondrial genomes from environmental DNA. *Methods in Ecology and Evolution*. 2017. 8(15). 1888-1898. doi: 10.1111/2041-210X.12836
19. Flandrois JP, Brochier-Armanet C, Briolay J et al. Taxonomic assignment of uncultured prokaryotes with long range PCR targeting the spectinomycin operon.

Res Microbiol. 2019. 170(6-7). 280-287. doi: 10.1016/j.resmic.2019.06.005
20. Foord OS, Rose EA. Long-distance PCR. *PCR Methods Appl*. 1994. 3(6). S149-S161. doi: 10.1101/gr.3.6.s149
21. Fromenty B, Demeilliers C, Mansouri A et al. *Escherichia coli* exonuclease III enhances long PCR amplification of damaged DNA templates. *Nucleic Acids Res*. 2000. 28(11). E50. doi: 10.1093/nar/28.11.e50
22. Green MR, Sambrook J. Long and Accurate Polymerase Chain Reaction (LA PCR). *Cold Spring Harb Protoc*. 2019. 2019(3). doi: 10.1101/pdb.prot095158
23. Grujic D, Strezoska Z, Crkvenjakov R. High throughput PCR procedure for up to 6-kb lengths of DNA. *Biotechniques*. 1994. 17(2). 291-292, 294.
24. Her C, Weinshilboum RM. Rapid restriction mapping by use of long PCR. *Biotechniques*. 1995. 19(4). 530-532.
25. Her C, Weinshilboum R. Long PCR: selective suppression by restriction endonuclease digestion. *Biotechniques*. 1996. 21(5). 764-766. doi: 10.2144/96215bm01
26. Her C, Weinshilboum RM. Endonuclease-mediated long PCR and its application to restriction mapping. *Curr Issues Mol Biol*. 1999. 1(1-2). 77-87.
27. Hogrefe HH, Borns MC. Long-range PCR with a DNA polymerase fusion. *Methods Mol Biol*. 2011. 687. 17-23. doi: 10.1007/978-1-60761-944-4_2
28. Hogrefe HH, Hansen CJ, Scott BR et al. Archaeal dUTPase enhances PCR amplifications with archaeal DNA polymerases by preventing dUTP incorporation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002. 99(2). 596-601. doi: 10.1073/pnas.012372799
29. Jeffreys AJ, Wilson V, Neumann R et al. Amplification of human minisatellites by the polymerase chain reaction: towards DNA fingerprinting of single cells. *Nucleic Acids Res*. 1988. 16(23). 10953-10971. doi: 10.1093/nar/16.23.10953
30. Kainz P, Schmiedlechner A, Strack HB. *In vitro* amplification of DNA fragments greater than 10 kb. *Anal Biochem*. 1992. 202(1). 46-49. doi: 10.1016/0003-2697(92)90203-j
31. Kandel S, Hartzell SL, Ingold AK et al. Genomic surveillance of SARS-CoV-2 using long-range PCR primers. *Front Microbiol*. 2024. 15. 1272972. doi: 10.3389/fmicb.2024.1272972
32. Karunanathie H, Kee PS, Ng SF et al. PCR enhancers: Types, mechanisms, and applications in long-range PCR. *Biochimie*. 2022. 197. 130-143. doi: 10.1016/j.biochi.2022.02.009
33. Kee PS, Karunanathie H, Maggo SDS et al. Long-Range Polymerase Chain Reaction. *Methods Mol Biol*. 2023. 2967. 181-192. doi: 10.1007/978-1-0716-3358-8_15
34. Krishnan BR, Kersulyte D, Brikun I et al. Direct and crossover PCR amplification to facilitate Tn5supF-based sequencing of lambda phage clones. *Nucleic Acids Res*. 1991. 19(22). 6177-6182. doi: 10.1093/nar/19.22.6177
35. Lee H, Kim KN, Kee Chae Y. Reevaluating the capability of Taq DNA polymerase: long PCR amplification. *Protein Pept Lett*. 2007. 14(4). 321-323. doi: 10.2174/092986607780363934
36. Maga EA, Richardson T. Amplification of a 9.0-kb fragment using PCR. *Biotechniques*. 1991. 11(2). 185-186.
37. Mareso C, Albion E, Cozza W et al. Optimization of long-range PCR protocol to prepare filaggrin exon 3 libraries for PacBio long-read sequencing. *Mol Biol Rep*. 2023. 50(4). 3119-3127. doi: 10.1007/s11033-022-08170-x
38. Margulies M, Egholm M, Altman WE et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*. 2005. 437(7057). 376-380. doi: 10.1038/nature03959
39. McClinton B, Watson CM, Crinnion LA et al. Haplotyping Using Long-Range PCR and Nanopore Sequencing to Phase Variants: Lessons Learned From the ABCA4 Locus. *Lab Invest*. 2023. 103(8). 100160. doi: 10.1016/j.labinv.2023.100160
40. Michalatos-Beloin S, Tishkoff SA, Bentley KL et al. Molecular haplotyping of genetic markers 10 kb apart by allele-specific long-range PCR. *Nucleic Acids Res*. 1996. 24(23). 4841-4843. doi: 10.1093/nar/24.23.4841
41. Nagai M, Yoshida A, Sato N. Additive effects of bovine serum albumin, dithiothreitol, and glycerol on PCR. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1998. 44(1). 157-163. doi: 10.1080/15216549800201172
42. Nagano M, Nakamura T, Ozawa S et al. Allele-specific long-range PCR/sequencing method for allelic assignment of multiple single nucleotide polymorphisms. *J Biochem Biophys Methods*. 2003. 55(1). 1-9. doi: 10.1016/s0165-022x(02)00114-8
43. Ohler LD, Rose EA. Optimization of long-distance PCR using a transposon-based model system. *PCR Methods Appl*. 1992. 2(1). 51-59. doi: 10.1101/gr.2.1.51
44. Oscorbin IP, Boyarskikh UA, Zakabunin AI et al. DNA-Binding Domain of DNA Ligase from the Thermophilic Archaeon *Pyrococcus abyssi*: Improving Long-Range PCR and Neutralization of Heparin's Inhibitory Effect. *Appl Biochem Biotechnol*. 2015. 176(7). 1859-1869. doi: 10.1007/s12010-015-1683-2
45. Ponce MR, Micol JL. PCR amplification of long DNA fragments. *Nucleic Acids Res*. 1992. 20(3). 623. doi: 10.1093/nar/20.3.623
46. Quan ZJ, Li SA, Yang ZX et al. GREPore-seq: A Robust Workflow to Detect Changes After Gene Editing Through Long-range PCR and Nanopore Sequencing.

Genomics Proteomics Bioinformatics. 2023. 21(6). 1221-1236. doi: 10.1016/j.gpb.2022.06.002
47. Ribble W, Kane SD, Bullard JM. Long-Range PCR Amplification of DNA by DNA Polymerase III Holoenzyme from *Thermus thermophilus. Enzyme Res.* 2015. 2015. 837842. doi: 10.1155/2015/837842
48. Rodríguez RA, Bounty S, Linden KG. Long-range quantitative PCR for determining inactivation of adenovirus 2 by ultraviolet light. *J Appl Microbiol*. 2013. 114(6). 1854-1865. doi: 10.1111/jam.12169
49. Rychlik W, Spencer WJ, Rhoads RE. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification *in vitro*. *Nucleic Acids Res.* 1990. 18(21). 6409-6412. doi: 10.1093/nar/18.21.6409
50. Schwarz K, Hansen-Hagge T, Bartram C. Improved yields of long PCR products using gene 32 protein. *Nucleic Acids Res*. 1990. 18(4). 1079. doi: 10.1093/nar/18.4.1079
51. Seeman NC. Nucleic acid junctions and lattices. *J Theor Biol*. 1982. 99(2). 237-247. doi: 10.1016/0022-5193(82)90002-9
52. Skiadas J, Aston C, Samad A et al. Optical PCR: genomic analysis by long-range PCR and optical mapping. *Mamm Genome*. 1999. 10(10). 1005-1009. doi: 10.1007/s003359901148
53. Śpibida M, Krawczyk B, Zalewska-Piątek B et al. Fusion of DNA-binding domain of *Pyrococcus furiosus* ligase with TaqStoffel DNA polymerase as a useful tool in PCR with difficult targets. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2018. 102(2). 713-721. doi: 10.1007/s00253-017-8560-6
54. Tsoktouridis G, Merz CA, DelVecchio VG. Adaptor long-range PCR procedure for clone-specific characterization and chromosomal localization. *Biotechniques*. 2005. 38(6). 885-888. doi: 10.2144/05386ST02
55. Waggott W. Long range PCR. *Methods Mol Med.* 1998. 16. 81-91. doi: 10.1385/0-89603-499-2:81
56. Wandeler P, Camenisch G. Identifying Y-chromosomal diversity by long-template PCR. *Mol Ecol Resour*. 2011. 11(5). 835-841. doi: 10.1111/j.1755-0998.2011.03013.x
57. Zhang H, Chao J, Pan D et al. Folding super-sized DNA origami with scaffold strands from long-range PCR. *Chem Commun.* 2012. 48. 6405-6407. doi: 10.1039/c2cc32204h

References

1. Alayed B, Siddiqui S, Anand S et al. Long-Range PCR and Nanopore Sequencing Enables High-Throughput Detection of TCF4 Trinucleotide Repeat Expansions in Fuchs Endothelial Corneal Dystrophy. *Mol Diagn Ther*. 2025. doi: 10.1007/s40291-025-00803-8
2. Barnes WM. PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from lambda bacteriophage templates. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994. 91(6). 2216-2220. doi: 10.1073/pnas.91.6.2216
3. Chemeris AV, Aminev FG, Garafutdinov RR et al. DNA criminalistics. M.: Nauka. 2022. 466 S. (In Russian)
4. Chemeris DA, Magdanov EG, Mashkov OI et al. Hot start or time-release PCR. *Biomics*. 2011. 2(1). 1-8. (In Russian)
5. Cheng S, Chang SY, Gravitt P et al. Long PCR. *Nature*. 1994. 369(6482). 684-685. doi: 10.1038/369684a0
6. Cheng S, Chen Y, Monforte JA et al. Template integrity is essential for PCR amplification of 20- to 30-kb sequences from genomic DNA. *PCR Methods Appl.* 1995. 4(5). 294-298. doi: 10.1101/gr.4.5.294
7. Cheng S, Fockler C, Barnes WM et al. Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994a. 91(12). 5695-5699. doi: 10.1073/pnas.91.12.5695
8. Cheng S, Higuchi R, Stoneking M. Complete mitochondrial genome amplification. *Nat Genet*. 1994b. 7(3). 350-351. doi: 10.1038/ng0794-350
9. Cheng S, Kolmodin LA. XL PCR amplification of long targets from genomic DNA. *Methods Mol Biol.* 1997. 67. 17-29. doi: 10.1385/0-89603-483-6:17
10. Chua EW, Maggo S, Kennedy MA. Long Fragment Polymerase Chain Reaction. *Methods Mol Biol*. 2017. 1620. 65-74. doi: 10.1007/978-1-4939-7060-5_3
11. Chua EW, Miller AL, Kennedy MA. Choice of PCR microtube can impact on the success of long-range PCRs. *Anal Biochem*. 2015. 477. 115-117. doi: 10.1016/j.ab.2015.02.023
12. Davies PA, Gray G. Long-range PCR. *Methods Mol Biol*. 2002. 187. 51-55. doi: 10.1385/1-59259-273-2:051
13. Deiner K, Renshaw MA, Li Y et al. Long-range PCR allows sequencing of mitochondrial genomes from environmental DNA. *Methods in Ecology and Evolution*. 2017. 8(15). 1888-1898. doi: 10.1111/2041-210X.12836
14. Flandrois JP, Brochier-Armanet C, Briolay J et al. Taxonomic assignment of uncultured prokaryotes with long range PCR targeting the spectinomycin operon. *Res Microbiol*. 2019. 170(6-7). 280-287. doi: 10.1016/j.resmic.2019.06.005
15. Foord OS, Rose EA. Long-distance PCR. *PCR Methods Appl*. 1994. 3(6). S149-S161. doi: 10.1101/gr.3.6.s149
16. Fromenty B, Demeilliers C, Mansouri A et al. *Escherichia coli* exonuclease III enhances long PCR amplification of damaged DNA templates. *Nucleic Acids Res*. 2000. 28(11). E50. doi: 10.1093/nar/28.11.e50
17. Garafutdinov RR, Chemeris DA, Sakhabutdinova AR. PCR enhancers. II. Chemical and

biological substances. *Biomics*. 2025. 17(2). 157-169. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2025-12 (In Russian)
18. Garafutdinov RR, Sakhabutdinova AR, Chemeris DA et al. PCR enhancers. IV. Amplification of GC-rich templates. *Biomics*. 2025a. 17(2). 182-192. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2025-14 (In Russian)
19. Green MR, Sambrook J. Long and Accurate Polymerase Chain Reaction (LA PCR). *Cold Spring Harb Protoc*. 2019. 2019(3). doi: 10.1101/pdb.prot095158
20. Grujic D, Strezoska Z, Crkvenjakov R. High throughput PCR procedure for up to 6-kb lengths of DNA. *Biotechniques*. 1994. 17(2). 291-292, 294.
21. Her C, Weinshilboum RM. Rapid restriction mapping by use of long PCR. *Biotechniques*. 1995. 19(4). 530-532.
22. Her C, Weinshilboum R. Long PCR: selective suppression by restriction endonuclease digestion. *Biotechniques*. 1996. 21(5). 764-766. doi: 10.2144/96215bm01
23. Her C, Weinshilboum RM. Endonuclease-mediated long PCR and its application to restriction mapping. *Curr Issues Mol Biol*. 1999. 1(1-2). 77-87.
24. Hogrefe HH, Borns MC. Long-range PCR with a DNA polymerase fusion. *Methods Mol Biol*. 2011. 687. 17-23. doi: 10.1007/978-1-60761-944-4_2
25. Hogrefe HH, Hansen CJ, Scott BR et al. Archaeal dUTPase enhances PCR amplifications with archaeal DNA polymerases by preventing dUTP incorporation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002. 99(2). 596-601. doi: 10.1073/pnas.012372799
26. Ignatov KB, Kramarov VM. DNA ligases from thermophilic bacteria enhance PCR amplification of long DNA sequences. *Biochemistry (Mosc).* 2009. 74(5). 557-561. doi: 10.1134/s0006297909050113
27. Jeffreys AJ, Wilson V, Neumann R et al. Amplification of human minisatellites by the polymerase chain reaction: towards DNA fingerprinting of single cells. *Nucleic Acids Res*. 1988. 16(23). 10953-10971. doi: 10.1093/nar/16.23.10953
28. Kainz P, Schmiedlechner A, Strack HB. In vitro amplification of DNA fragments greater than 10 kb. *Anal Biochem*. 1992. 202(1). 46-49. doi: 10.1016/0003-2697(92)90203-j
29. Kandel S, Hartzell SL, Ingold AK et al. Genomic surveillance of SARS-CoV-2 using long-range PCR primers. *Front Microbiol*. 2024. 15. 1272972. doi: 10.3389/fmicb.2024.1272972
30. Karunanathie H, Kee PS, Ng SF et al. PCR enhancers: Types, mechanisms, and applications in long-range PCR. *Biochimie*. 2022. 197. 130-143. doi: 10.1016/j.biochi.2022.02.009
31. Kee PS, Karunanathie H, Maggo SDS et al. Long-Range Polymerase Chain Reaction. *Methods Mol Biol*. 2023. 2967. 181-192. doi: 10.1007/978-1-0716-3358-8_15
32. Krishnan BR, Kersulyte D, Brikun I et al. Direct and crossover PCR amplification to facilitate Tn5supF-based sequencing of lambda phage clones. *Nucleic Acids Res*. 1991. 19(22). 6177-6182. doi: 10.1093/nar/19.22.6177
33. Lee H, Kim KN, Kee Chae Y. Reevaluating the capability of Taq DNA polymerase: long PCR amplification. *Protein Pept Lett*. 2007. 14(4). 321-323. doi: 10.2174/092986607780363934
34. Maga EA, Richardson T. Amplification of a 9.0-kb fragment using PCR. *Biotechniques*. 1991. 11(2). 185-186.
35. Mareso C, Albion E, Cozza W et al. Optimization of long-range PCR protocol to prepare filaggrin exon 3 libraries for PacBio long-read sequencing. *Mol Biol Rep*. 2023. 50(4). 3119-3127. doi: 10.1007/s11033-022-08170-x
36. Margulies M, Egholm M, Altman WE et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*. 2005. 437(7057). 376-380. doi: 10.1038/nature03959
37. McClinton B, Watson CM, Crinnion LA et al. Haplotyping Using Long-Range PCR and Nanopore Sequencing to Phase Variants: Lessons Learned From the ABCA4 Locus. *Lab Invest*. 2023. 103(8). 100160. doi: 10.1016/j.labinv.2023.100160
38. Michalatos-Beloin S, Tishkoff SA, Bentley KL et al. Molecular haplotyping of genetic markers 10 kb apart by allele-specific long-range PCR. *Nucleic Acids Res*. 1996. 24(23). 4841-4843. doi: 10.1093/nar/24.23.4841
39. Nagai M, Yoshida A, Sato N. Additive effects of bovine serum albumin, dithiothreitol, and glycerol on PCR. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1998. 44(1). 157-163. doi: 10.1080/15216549800201172
40. Nagano M, Nakamura T, Ozawa S et al. Allele-specific long-range PCR/sequencing method for allelic assignment of multiple single nucleotide polymorphisms. *J Biochem Biophys Methods*. 2003. 55(1). 1-9. doi: 10.1016/s0165-022x(02)00114-8
41. Ohler LD, Rose EA. Optimization of long-distance PCR using a transposon-based model system. *PCR Methods Appl*. 1992. 2(1). 51-59. doi: 10.1101/gr.2.1.51
42. Oscorbin IP, Boyarskikh UA, Zakabunin AI et al. DNA-Binding Domain of DNA Ligase from the Thermophilic Archaeon *Pyrococcus abyssi*: Improving Long-Range PCR and Neutralization of Heparin's Inhibitory Effect. *Appl Biochem Biotechnol*. 2015. 176(7). 1859-1869. doi: 10.1007/s12010-015-1683-2
43. Ponce MR, Micol JL. PCR amplification of long DNA fragments. *Nucleic Acids Res*. 1992. 20(3). 623. doi: 10.1093/nar/20.3.623
44. Quan ZJ, Li SA, Yang ZX et al. GREPore-seq: A Robust Workflow to Detect Changes After Gene Editing

Through Long-range PCR and Nanopore Sequencing. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2023. 21(6). 1221-1236. doi: 10.1016/j.gpb.2022.06.002

45. Ribble W, Kane SD, Bullard JM. Long-Range PCR Amplification of DNA by DNA Polymerase III Holoenzyme from *Thermus thermophilus. Enzyme Res.* 2015. 2015. 837842. doi: 10.1155/2015/837842
46. Rodríguez RA, Bounty S, Linden KG. Long-range quantitative PCR for determining inactivation of adenovirus 2 by ultraviolet light. *J Appl Microbiol*. 2013. 114(6). 1854-1865. doi: 10.1111/jam.12169
47. Rychlik W, Spencer WJ, Rhoads RE. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic Acids Res.* 1990. 18(21). 6409-6412. doi: 10.1093/nar/18.21.6409
48. Schwarz K, Hansen-Hagge T, Bartram C. Improved yields of long PCR products using gene 32 protein. *Nucleic Acids Res*. 1990. 18(4). 1079. doi: 10.1093/nar/18.4.1079
49. Seeman NC. Nucleic acid junctions and lattices. *J Theor Biol*. 1982. 99(2). 237-247. doi: 10.1016/0022-5193(82)90002-9
50. Skiadas J, Aston C, Samad A et al. Optical PCR: genomic analysis by long-range PCR and optical mapping. *Mamm Genome*. 1999. 10(10). 1005-1009. doi: 10.1007/s003359901148
51. Śpibida M, Krawczyk B, Zalewska-Piątek B et al. Fusion of DNA-binding domain of *Pyrococcus furiosus* ligase with TaqStoffel DNA polymerase as a useful tool in PCR with difficult targets. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2018. 102(2). 713-721. doi: 10.1007/s00253-017-8560-6
52. Tsoktouridis G, Merz CA, DelVecchio VG. Adaptor long-range PCR procedure for clone-specific characterization and chromosomal localization. *Biotechniques*. 2005. 38(6). 885-888. doi: 10.2144/05386ST02
53. Waggott W. Long range PCR. *Methods Mol Med.* 1998. 16. 81-91. doi: 10.1385/0-89603-499-2:81
54. Wandeler P, Camenisch G. Identifying Y-chromosomal diversity by long-template PCR. *Mol Ecol Resour*. 2011. 11(5). 835-841. doi: 10.1111/j.1755-0998.2011.03013.x
55. Zhang H, Chao J, Pan D et al. Folding super-sized DNA origami with scaffold strands from long-range PCR. *Chem Commun.* 2012. 48. 6405-6407. doi: 10.1039/c2cc32204h
56. Zubov VV, Chemeris DA. A simple fractionation of DNA molecules by size via their precipitation. *Biomics*. 2025. 17(2). 139-156. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2025-11 (In Russian)
57. Zubov VV, Sakhabutdinova AR, Chemeris DA et al. Variants of PCR with more than two primers. II. The principle and features of multiplex PCR. *Biomics*. 2024. V.16(2). P. 234-243. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2024-14 (In Russian)