BIOMICS

ISSN 2221-6197 http://biomicsj.ru

Энхансеры ПЦР. IV. Амплификация GC-богатых ДНК-матриц

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

[1]Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия,
[2]ООО «ГЕНВЕД», Москва, Россия
*E-mail: garafutdinovr@mail.ru

Резюме

Амплификация с помощью ПЦР так называемых «трудных» матриц, к которым относятся и нуклеотидные последовательности с высоким содержанием GC-пар, представляет определенную проблему. При этом четкой границы процентного содержания GC-пар, позволяющей причислять ДНК-мишени к трудным матрицам, не существует. Тем не менее, таковыми можно считать те, у которых GC-состав превышает 60%. При этом общее содержание GC-пар в некой последовательности может быть относительно невысоким, но в ней может локально находиться участок или участки с экстремально высоким GC-составом. Поэтому простое упоминание процентного содержания GC-пар дает лишь очень грубую характеристику мишени, поскольку немалый вклад в эффективность амплификации вносит вся нуклеотидная последовательность выбранного участка, а она для различных мишеней каждый раз разная. Ввиду того, что GC-пары формируют три водородных связи между азотистыми основаниями в отличие от AT-пар, у которых таких связей всего две, GC-богатые фрагменты ДНК после этапа денатурации в гораздо большей степени склонны к образованию прочных вторичных структур, преодолеть которые ДНК-полимераза в обычных условиях при построении новой комплементарной цепи бывает неспособна. Для амплификации GC-богатых мишеней необходимо использовать различные энхансеры ПЦР, оказывающие разное воздействие на полимеризацию цепей ДНК. Ряд энхансеров снижают температуру плавления ДНК и тем самым препятствуют образованию вторичных структур, другие вещества уменьшают влияние энхансеров на ферментативную активность ДНК-полимеразы, обеспечивая синергетический эффект. Использование модифицированных аналогов дГТФ или дЦТФ дестабилизирует GC-пары, лишая их возможности образовывать вторичные структуры. Важное значение имеют особенности термоциклирования в ПЦР в виде субциклирования на этапе отжига праймеров, а также кратковременные высокотемпературные прогревы и прочие вариации смены температур. Однако единого рецепта для проведения ПЦР с любыми GC-богатыми матрицами не существует, и чтобы достичь желаемого результата, необходимо опробовать различные энхансеры и/или их комбинации, разные ДНК-полимеразы, а также режимы термоциклирования.

Ключевые слова: ПЦР, GC-богатая мишень, энхансер, ДМСО, бетаин, глицерин, формамид, 7-дезаза-дГТФ, ДНК-полимераза

Цитирование: Гарафутдинов Р.Р., Сахабутдинова А.Р., Чемерис Д.А., Чемерис А.В. Энхансеры ПЦР. IV. Амплификация GC-богатых матриц. *Biomics*. 2025. 17(2). 182-192. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2025-14

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

PCR enhancers. IV. Amplification of GC-rich DNA templates

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

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

Resume

PCR of so-called "difficult" templates, including DNA regions with a high content of GC pairs, poses a certain problem. However, there is no clear boundary of the percentage of GC pairs for assigning DNA fragments to difficult targets. Nevertheless, those with a GC composition exceeding 60% can be considered as such. Moreover, the total content of GC pairs in a certain sequence may be relatively low, but there may be a regions with an extremely high GC composition locally in it. In this regard, the simple mention of the percentage of GC pairs provides only a very rough description of the templates, since the entire nucleotide sequence of the selected target makes a significant contribution to the efficiency of the amplification process, and it is different for various targets each time. Due to the fact that GC pairs form three hydrogen bonds between complementary nitrogen bases, unlike AT pairs, which have only two such bonds, GC-rich DNA fragments after the denaturation stage are much more prone to forming strong secondary structures, which DNA polymerase cannot overcome when synthesizing a new complementary chain under normal conditions. To amplify GC-rich targets, it is necessary to use various PCR enhancers that have different effects on the polymerization process of the DNA chain. A number of enhancers in the form of organic solvents reduce the melting temperature of DNA and thereby prevent the formation of secondary structures, while others reduce the effect of these solvents on the enzymatic activity of DNA polymerase, providing a synergistic effect. The use of modified analogues of dGTP or dCTP destabilizes GC pairs, depriving them of the opportunity to form secondary structures. The features of thermal cycling during PCR, in the form of subcycling at the annealing stage, as well as short-term high-temperature pulses and other temperature variations, are important. However, there is no single recipe for PCR with any GC-rich templates, and in order to achieve the desired result, it is necessary to try various enhancers and/or combinations of them, different DNA polymerases, as well as thermal cycling modes.

Keywords: PCR, GC-rich target, enhancer, DMSO, betaine, glycerol, formamide, 7-deaza-dGTP, DNA polymerase

Citation: Garafutdinov R.R., Sakhabutdinova A.R., Chemeris D.A., Chemeris A.V. PCR enhancers. IV. Amplification of GC-rich templates. *Biomics*. 2025. 17(2). 182-192. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2025-14 (In Russian)

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

Введение

Ранее мы рассмотрели использование целого ряда соединений, улучшающих протекание ПЦР (ПЦР-энхансеров) [Гарафутдинов и др. (Garafutdinov et al.), 2025] и способствующих амплификации так называемых «трудных» ДНК-матриц в виде длинных фрагментов ДНК [Зубов и др. (Zubov et al.), 2025]. Но к трудным матрицам относятся также мишени с высоким GC-составом, работа с которыми имеет свои особенности. Еще одним типом трудных матриц являются участки ДНК, состоящие из большого числа тринуклеотидных повторов типа CTG и им подобных, часто вызывающих генетические заболевания. Так, в одной из статей сообщается об амплификации фрагмента ДНК размером около 2.8 т.п.н., состоящего из 940 CGG повторов и, соответственно, содержащего 100% GC-пар без учета праймерных последовательностей [Orpana et al., 2012]. Однако помимо высокого GC-состава подобные матрицы из-за множественных повторов вызывают проскальзывание цепей при репликации ДНК, что привносит дополнительные сложности, и рассмотрение способов их амплификации для определения числа таких повторов требует отдельной статьи. Хотя использованного варианта ПЦР в упомянутой статье [Orpana et al., 2012] здесь еще коснемся.

Некоторые подходы, предложенные для облегчения амплификации GC-богатых матриц, основаны на том, чтобы вместо нуклеотидов dG и dC в строящуюся цепь ДНК встраивать их аналоги, дестабилизирующие GC-пары. Другие подходы

рассчитаны на ослабление водородных связей между всеми парами азотистых оснований, что уменьшает вероятность образования прочных вторичных структур. Предлагается использовать ДНК-полимеразы, способные эффективно преодолевать GC-богатые участки. Оптимизация параметров термоциклирования также позволяет амплифицировать GC-богатые участки.

В недавней обзорной статье [Karunanathie et al., 2022], посвященной различным ПЦР-энхансерам, определенное внимание уделено и амплификации GC-богатых матриц, однако его желательно дополнить, поскольку некоторые важные подходы в нем не были отражены. В данном обзоре будем описывать в хронологическом порядке появление и суть предлагаемых улучшений амплификации GC-богатых, дабы показать развитие подобных исследований в мире. Однако ввиду огромного количества информации по этой тематике, данный обзор также не может претендовать на исчерпывающую полноту. К тому же статьи, в которых уделялось наибольшее внимание не проведению ПЦР как таковой, а секвенированию GC-богатых матриц или сайт-направленному мутагенезу с такими участками, останутся здесь без внимания, поскольку заслуживают отдельных обзорных публикаций.

Общие замечания

Главной причиной трудностей амплификации GC-богатых участков ДНК в ходе ПЦР служит после этапа денатурации и непродолжительного пребывания молекул ДНК в одноцепочечном состоянии образование ими прочных вторичных структур, в первую очередь шпилечных, которые ДНК-полимеразе бывает затруднительно или даже невозможно преодолеть без создания подходящих условий. Это происходит ввиду образования между GC-парами трех водородных связей в отличие от двух подобных связей между парами A-T. При этом четкой границы в виде процентного содержания GC-пар, позволяющей причислять ДНК-мишени к трудным матрицам, не существует. Тем не менее, таковыми условно можно считать те, у которых GC-состав превышает 60%. Однако следует иметь в виду, что общее содержание GC-пар в некой последовательности может быть относительно невысоким, но при этом в ней может находиться участок или участки с экстремально высоким GC-составом, прохождение которого ДНК-полимеразой при обычных условиях затруднено.

Высокий GC-состав участков ДНК требует повышенной температуры для денатурации цепей и более продолжительного времени пребывания матрицы на этой стадии ПЦР. Так, перед термоциклированием рекомендуется даже выдерживать ДНК при температуре 96 или даже 98°C в течение 10-15 мин. Однако и это в отдельных случаях может не помочь. Так, в одной из статей авторы обратили внимание, что им удалось амплифицировать фрагмент ДНК размером 145 п.н., содержащий 81% GC-пар, только после того как на предамплификационном этапе они денатурировали его с помощью 0.4 N NaOH при том, что ни прогрев при 100°C в течение 5 мин перед проведением ПЦР, ни добавление ДМСО или глицерина вместе и по отдельности, ни замена Taq полимеразы на более термостабильную Pfu полимеразу не оказывало существенного воздействия [Agarwal, Perl, 1993]. Также необходимо иметь в виду, что при проведении мультиплексной ПЦР, когда одновременно амплифицируются мишени с разным GC-составом, даже при успешной наработке специфичных продуктов, те, что характеризуются более высоким содержанием GC-пар, могут амплифицироваться хуже и тем самым приводить к искажению результатов, если требуется количественная (в том числе относительная) оценка числа исходных мишеней. Подстерегают экспериментаторов и другие трудности при проведении ПЦР с GC-богатыми матрицами, в том числе в виде полного отсутствия амплификации или появления неспецифичных продуктов ПЦР, однако большинство из них в целом решаемы с помощью различных энхансеров ПЦР и особенностей проведения реакции.

Многие фирмы, выпускающие продукцию для ПЦР, предлагают для амплификации GC-богатых матриц обладающие повышенной термостабильностью ДНК-полимеразы, специальные буферные растворы, а также различные добавки под торговыми наименованиями, скрывающими их истинный состав и не дающими возможность сопоставлять их с теми или иными конкретными соединениями. В этой связи в данной статье внимание будет уделяться публикациям, в которых испытывались известные реагенты и комбинации из них.

Использование индивидуальных соединений в качестве усилителей ПЦР

В самой первой статье, посвященной ПЦР-амплификации GC-богатой последовательности и вышедшей вскоре после начала применения в ПЦР термостабильной ДНК-полимеразы, описан способ наработки относительно короткого ампликона, основанный на использовании аналога дГТФ – 7-деаза-2'-дГТФ, образующего с дезоксицитозином две водородные связи по типу Хугстиновских, а не Уотсон-Криковских пар [McConlogue et al., 1988]. При этом мишень размером 310 п.н. имела 74% GC-

состав и могла формировать сразу две шпилечные структуры, затрудняющие прохождение ДНК-полимеразы. Использование в реакционной смеси 7-деаза-2'-дГТФ с дГТФ в пропорции 3:1 позволило амплифицировать нужный фрагмент ДНК. Позже другими авторами использовано то же соотношение 7-деаза-2'-дГТФ и дГТФ, но был применен «горячий» старт, что обеспечило амплификацию матриц длиной от 156 до 642 п.н. с GC-составом от 60 до 79% [Shore, Paul, 2010]. Для амплификации фрагмента ДНК размером 306 п.н., несущего более 70% GC, использовали в дополнение к дГТФ его аналог – дезоксиинозин – в пропорции 1:4 [Turner, Jenkins, 1995]. В качестве альтернативы 7-деаза-2'-дГТФ с целью дестабилизации GC-пар предлагалось также использовать в ПЦР с GC-богатыми матрицами производное дезоксицитозина N^4-метил-2'-дЦТФ [Flores-Juárez et al., 2013; 2016]. Нужно заметить, что аналоги гуанина могут помешать выявлению однонуклеотидного полиморфизма ввиду неоднозначности их спаривания при взаимодействии с комплементарными цепями, а ДНК с 7-деаза-2'-дГМФ к тому же хуже окрашивается бромистым этидием при детекции таких ампликонов после их разделения гель-электрофорезом.

В одной из ранних работ проводилась амплификация пяти ДНК-матриц с умеренным GC-составом (~55%), однако авторы показали, что добавление формамида с конечными концентрациями 1.25, 2.5, 5 и 10% значительно улучшает наработку этих ампликонов при том, что добавление диметилсульфоксида (ДМСО) в концентрациях 2.5, 5, 10 и 15% почти никак не повлияло на эффективность ПЦР [Sarkar et al., 1990]. Также была амплифицирована ДНК-матрица с 57%-ным GC-составом размером 368 п.н. с использованием ряда потенциальных ПЦР-энхансеров и показано, что формамид (1.2-5%), глицерин (0.5-15%), ДМСО (5%), детергенты Tween-20 и Nonidet P-40 (до 2%) увеличивали наработку данного ампликона в разной степени в зависимости от используемой ДНК-полимеразы [Varadaraj, Skinner, 1994]. Другими авторами обнаружено, что 10%-ный ДМСО, а также 10%-ный глицерин ингибируют наработку Taq полимеразой ампликона длиной 511 п.н., в составе которого находился участок размером 266 п.н. с 66% GC-пар, тогда как 1 М бетаин заметно улучшал его амплификацию [Henke et al., 1997].

Целый ряд низкомолекулярных сульфонов (метилсульфон, этилсульфон, n-пропилсульфон), а также циклических соединений (сульфолан, 2,4-диметилсульфолан, сульфолен) были испытаны в качестве энхансеров ПЦР при амплификации мишени размером 996 п.н. с 64% GC-пар [Chakrabarti, Schutt, 2001]. Наилучшие результаты, превзошедшие ДМСО, показали сульфолан и метилсульфон. В своей следующей работе эти авторы проводили амплификацию мишени длиной 660 п.н. с 58% GC-пар в присутствии ряда сульфоксидов (тетраметиленсульфоксид, пропилсульфоксид, бутилсульфоксид и метил *sec*-бутилсульфоксид) в сравнении с ДМСО [Chakrabarti, Schutt, 2002]. Помимо этой мишени матрицами служили также участки ДНК размерами 990 и 511 п.н., причем последний содержал фрагмент в 158 п.н. с 73% GC-пар. Лучше всех себя проявил тетраметиленсульфоксид, в том числе в меньшей в 2-3 раза концентрации, нежели ДМСО.

Производное эктоина – гомоэктоин, оказался достаточно эффективным энхансером ПЦР, способствовав амплификации участка ДНК размером 477 п.н. с 72% GC-пар в концентрации 0.5-1 М [Schnoor et al., 2004]. При этом гомоэктоин снижал температуру плавления ампликона, тогда как гидроксиэктоин ее, напротив, повышал.

Показано, что использование в реакционной смеси ионных жидкостей не только улучшает амплификацию GC-богатых участков ДНК, но и повышает специфичность реакции. В работе [Shi et al., 2012] были опробованы 24 ионные жидкости на основе бициклического имидазола: его бромиды и иодиды с разными боковыми радикалами (от CH_3 до C_6H_{13}), среди которых наибольшую эффективность при амплификации мишени длиной 266 п.н. с 80% GC-составом продемонстрировал бромид бутил-производного в концентрации 70 мМ. При сравнении данного соединения и других добавок (KBr, ДМСО и бетаин) было обнаружено, что специфичная амплификации наблюдалась лишь с этим соединением, причем не только для GC-богатого ампликона, но и для ампликона с 55% GC-пар размером 501 п.н. При этом бромид бутил-производного бициклического имидазола несколько снижал температуру плавления GC-богатого ампликона.

Из 104 матриц размерами 700-800 п.н., имеющих GC-состав от 60 до 80%, для 101 были наработаны ампликоны в присутствии добавок, которыми служили бетаин (конечная концентрация в реакционной смеси 2.2 М), этиленгликоль (конечная концентрация 1.075 М) и 1,2-пропандиол (конечная концентрация 0.816 М). При этом с тремя оставшимися матрицами амплификация происходила только в присутствии бетаина. Тем не менее, авторы сделали вывод, что по эффективности наработки целевого продукта по остальным мишеням он уступает и этиленгликолю, и 1,2-пропандиолу [Zhang et al., 2009]. Позже другими авторами при проведении ПЦР в присутствии 1,2-пропандиола, ДМСО и этиленгликоля было показано, что лучшие результаты

по наработке GC-богатого ампликона длиной 512 п.н. получаются с использованием 1,2-пропандиола [Mousavian et al., 2014]. Проведение ПЦР в присутствии L-карнитина в концентрации от 0.48 до 1.2 мол/л способствовало амплификации GC-богатых матриц, тогда как для мишеней с обычным GC-составом «работала» концентрация от 0.12 до 0.72 мол/л [Zhang et al., 2010].

Обстоятельное исследование выполнено при амплификации двух матриц размерами 283 и 322 п.н., характеризующихся 84% и 75.5% GC-пар, энхансерами для чего выступили цитрат аммония-висмута и субкарбонат висмута, предварительно растворенные в смеси ДМСО и глицерина [Yang et al., 2023]. При этом при проведении ПЦР в качестве позитивного контроля, с которым происходила наработка целевых ампликонов, использовалась смесь ДМСО (3%) и глицерина (5%), без которой амплификация не шла совсем. Для первой матрицы было обнаружено, что максимальная наработка ампликона происходила при весьма низких концентрациях цитрата аммония-висмута (0.22 нМ) и субкарбоната висмута (0.1 мМ), тогда как для второй матрицы они составили 0.022 мМ и 0.02 мМ, соответственно. Рассуждая о механизмах действия этих солей висмута авторы пришли к заключению, что они снижают температуру плавления ДНК и способны абсорбировать на себе цепи ДНК, а также ДНК-полимеразы.

Нами были испытаны углеводы (моно- и дисахариды: сахароза, лактоза, глюкоза, фруктоза, галактоза, манноза), а также высокомолекулярные инулин и фиколл 400 при проведении ПЦР с использованием нескольких ДНК-полимераз с целью амплификации фрагмента ДНК размером 525 п.н., содержащего 66% GC-пар [Sakhabutdinova et al., 2020]. При этом обнаружено, что эффективность ПЦР при ее проведении в реальном времени в большей степени улучшали манноза, трегалоза, глюкоза, фруктоза и сахароза, а последняя к тому же обеспечивала амплификацию только целевого продукта, повышая специфичность процесса.

Основательное исследование по влиянию различных энхансеров на ПЦР было выполнено с использованием матриц с различным содержанием GC-пар: 58% для ампликона размером 197 п.н., 68% для ампликона размером 150 п.н. и 78% для ампликона размером 208 п.н. [Xie et al., 2024]. В этой работе были изучены 9 разных соединений: ДМСО, этиленгликоль, 1,2-пропиленгликоль, 1,3-пропиленгликоль, формамид, глицерин, бетаин, сахароза и трегалоза. Было обнаружено, что все эти вещества оказывают некоторый ингибирующий эффект при амплификации матрицы с 58% GC-пар, тогда как при амплификации матрицы с 68% часть из них также ингибировала реакцию, а трегалоза, сахароза и глицерин оказывали положительный эффект. При этом все эти энхансеры ПЦР повышали эффективность амплификации матрицы с 78% GC-пар. Также было показано, что трегалоза, сахароза и бетаин улучшают термостабильность полимеразы, проявляя в том числе синергетический эффект. Было предложено при амплификации GC-богатых участков ДНК либо ограничиваться одним 1М бетаином, либо использовать 0.5М бетаина с 0.2М сахарозой или 1М бетаин с 0.1М сахарозой, формируя фактически комбинации энхансеров, рассмотрению которых посвящен следующий раздел.

Использование комбинации соединений в качестве усилителей ПЦР

Поскольку в ряде ранних статей были получены сведения о наиболее успешных усилителях ПЦР при амплификации GC-богатых участков, то неудивительно, что во многих работах в дальнейшем исследовались их комбинации с другими соединениями, проявляющими энхансерный эффект. Так, в нескольких статьях сообщается об использовании комбинаций бетаина и ДМСО для усиления амплификации GC-богатых матриц разной длины, достигающих в ряде случаев 89% GC-пар [Kang et al., 2005; Shi et al., 2006; Seifi et al., 2012]. Было также показано, что использование 7-деаза-2’-дГТФ вкупе с бетаином и ДМСО представляет подходящую смесь для амплификации GC-богатых участков, содержащих от 67 до 79% GC-пар размерами 392 и 737 п.н. [Musso et al., 2006]. При амплификации фрагмента ДНК длиной 375 п.н., содержащего 81% GC-пар, успешная наработка продукта шла в присутствии 2М бетаина или 1М бетаина вкупе с 5% ДМСО, дополнительно усиливающим амплификацию [Lotte Hansen, Justesen, 2006].

В одной из работ были составлены специальные энхансерные смеси preCES-I, preCES-II и preCES-III (preliminary combinatorial enhancer solution) на основе несколько отличающихся концентраций бетаина, ДМСО и дитиотрейтола (в первую смесь был также добавлен БСА для стабилизации ДНК полимеразы), что позволило повысить специфичность и эффективность амплификации матриц с 71-75% GC-пар [Ralser et al., 2006].

Выше уже отмечалось, что 1,2-пропандиол для ряда GC-богатых матриц обеспечивает лучшую наработку ампликонов, однако его совместное использование с трегалозой позволило как нейтрализовать ингибиторы ПЦР, так и провести эффективную амплификацию GC-богатого участка

длиной 392 п.н., несущего 79% GC-пар [Horáková et al., 2011].

При амплификации большого числа матриц размерами от 392 до 7103 п.н. и с GC-составами от 66 до 73% в присутствии или формамида, или ДМСО с добавлением бычьего сывороточного альбумина (БСА) было изучено влияние последнего на эффективность протекания ПЦР [Farell, Alexandre, 2012]. С учетом низкой термостабильности БСА авторы добавляли его в каждом десятом цикле ПЦР, что позволило им назвать такую амплификацию как 'BSA PCR step'. При этом было показано, что добавление БСА улучшает эффективность наработки целевых ампликонов и был сделан вывод, что влияние БСА заключалось в купировании им негативного влияния органических растворителей на ДНК-полимеразу.

Оптимизация стандартных компонентов реакционных смесей и параметров термоциклирования

Вопросам оптимизации обычной ПЦР на протяжении всех лет существования этой реакции уделялось значительное внимание, и хотя амплификация GC-богатых матриц имеет свои особенности, общие принципы протекания ПЦР и ее желаемого улучшения свойственны и им. Мы тоже подготовили несколько обзорных статей, посвященных повышению эффективности обычной ПЦР, включая так называемый «горячий» или отложенный старт [Чемерис и др. (Chemeris et al.), 2011], устранению причин ложно-негативной ПЦР [Чемерис и др. (Chemeris et al.), 2012], а также различным энхансерам, повышающим наработку ампликонов [Гарафутдинов и др. (Garafutdinov et al.), 2025]. Содержащиеся в них рекомендации в той или иной степени пригодны и для проведения ПЦР с GC-богатыми матрицами.

Нельзя не уделить внимание чуть ли не самому простому (не считая воды как растворителя), но при этом очень важному компоненту реакционной смеси, а именно $MgCl_2$, действие которого многогранно. Так, ионы Mg^{2+} обеспечивают функционирование ДНК-полимеразы, являясь ее кофактором, способствуют отжигу праймеров, связываются с α-фосфатной группой дНТФ, позволяя отщепить β- и γ-фосфатные группы. Используемой в обычной ПЦР 1-2 мМ концентрации $MgCl_2$ может оказаться недостаточно для амплификации GC-богатых участков, и ее нужно увеличивать до 4 мМ.

Также важным компонентом ПЦР, от эффективной работы которого зависит построение новых комплементарных цепей ДНК, является термостабильная ДНК-полимераза. Поскольку эти ферменты, выделенные из разных источников, характеризуются своими оптимумами ферментативной активности, то следует выбирать те, которые более подходят для конкретных случаев. Имеются публикации, где в связи с амплификацией GC-богатых матриц сравнивались разные ДНК-полимеразы [Dutton et al., 1993; Varadaraj, Skinner, 1994; Liu, Sommer, 1998; Strien et al., 2013]. Так, в одной из ранних работ, посвященных выработке условия для амплификации ряда GC-богатых матриц (71-75%), были испытаны различные ДНК-полимеразы: Taq, Tth, Pfu, Vent, Deep Vent (не все из которых оказались пригодны для такой ПЦР), а также менялись параметры термоциклирования [Dutton et al., 1993]. Было показано, что температуры 94°C для денатурации подобных матриц недостаточно и требуется применять нагрев до 98°C в течение одной минуты и использовать продолжительный этап отжига/элонгации в двухстадийной ПЦР, достигающий 5 мин. При этом также отмечено, что для матриц с еще более высоким GC-составом необходимо использовать энхансеры в виде ДМСО или формамида.

В том же году описана двухстадийная ПЦР, названная 'hot PCR' и совмещающая этапы отжига и элонгации, поскольку использовались праймеры, отжигающиеся при температуре 70-74°C, что дополнительно сокращало время реакции, поскольку диапазон меняющихся температур был относительно небольшой [Schuchard et al., 1993]. В этой работе удалось амплифицировать фрагменты ДНК размерами 111 и 179 п.н., содержащие 74% и 76% GC-пар соответственно.

В еще одной статье испытывались различные ДНК полимеразы и их смеси: Taq, Pwo, Vent, eLONGase, Tth, Tfl, Bio-X-Act [Liu, Sommer, 1998]. Эта работа интересна еще и тем, что в предложенном варианте S-PCR (Subcycling-PCR) для амплификации участков ДНК длиной до 12 т.п.н., в которых GC-богатые последовательности соседствовали с обычными, применялись такие энхансеры как ДМСО и 7-деаза-2'-дГТФ. Но наибольшего внимания заслуживают особенности термоциклирования, согласно которым на каждом этапе отжига осуществлялись свои субциклы, заключающиеся в перемене температур в диапазоне 65- 60°C.

Собственно, аналогичный подход с субциклированием на стадии отжига лежит в основе предложенных ранее так называемых Touchdown PCR и Stepdown PCR. Здесь можно указать на работу, в которой, несмотря на использование ДМСО, формамида и одного коммерческого препарата, не удалось амплифицировать GC-богатую (более 70%) мишень длиной 267 п.н., представляющую собой фрагмент промоторной области гена, несущего множественные CpG-островки, и только формат

Touchdown PCR позволил достигнуть нужного результата [Hubé et al., 2005]. При амплификации GC-богатых матриц эти варианты ПЦР нашли свое применение, трансформировавшись в новые варианты Slowdown PCR, длящиеся очень долго – около 5 часов [Bachman et al., 2003; Frey et al., 2008]. В этих работах применялся также 7-деаза-2'-дГТФ, что позволило среди прочих матриц амплифицировать мишень размером 241 п.н. с почти 84% GC-пар. Другими авторами был предложен свой вариант ПЦР, названный SAFE (satisfactory, adaptable, fast, efficient) и также использующий субциклирование на этапе отжига праймеров [Wei et al., 2010]. В их случае дополнительно в качестве комбинаций энхансеров использовались в разных вариантах 5% ДМСО, 5% глицерин, 1.4 М бетаин, а также 7-деаза-2'-дГТФ, что позволило наработать ампликон размером 826 п.н. с более чем 80% GC-пар. При этом в ходе ПЦР ввиду ее длительности приходилось дважды добавлять новые порции полимеразы.

Отдельный интерес представляет вариант ПЦР, получивший название HPE-PCR (Heat Pulse Extension), отличительной особенностью которого являются кратковременные повышения температуры на стадии элонгации [Orpana et al., 2012]. Такое повышение до 80-90ºC способствует расплетению возможных шпилечных структур на время, достаточное для того, чтобы полимераза смогла встроить несколько нуклеотидов пусть даже не в самых оптимальных температурных условиях, что ликвидирует вторичную структуру в этом месте. С помощью 14 таких пульсов на каждой стадии элонгации авторам удалось амплифицировать протяженный участок ДНК (около 2.8 т.п.н.) со 100% GC-пар в виде триплетов CGG.

Безусловно, температурный режим в ходе ПЦР крайне важен и для отжига праймеров, несколько в меньшей степени для этапа элонгации[1], но и для денатурации ампликонов, чтобы мог начаться новый цикл [Garafutdinov et al., 2017]. При этом для амплификации GC-богатых матриц важен не только режим термоциклирования, но и продолжительность разных этапов. Так, в одной из работ был проведен теоретический анализ, подкрепленный затем «мокрыми» экспериментами с мишенями, содержащими около 79 и 53% GC-пар, из чего следует, что этап отжига праймеров должен быть весьма коротким и составлять от 3 до 6 сек в зависимости от самой температуры отжига, но это не является панацеей и нужны какие-либо энхансеры, в частности, применялся 11% ДМСО [Mamedov et al., 2008]. Также отмечалось, что если этап отжига становится длиннее 10 сек, то это ведет к появлению неспецифичных продуктов. На самом деле это можно объяснить тем, что у праймеров «появляется» больше времени на поиск мест, где они могут отжечься даже частично, а с учетом их высокого GC-состава[2] таких возможностей оказывается немало. Здесь следует заметить, что упоминаемое авторами столь короткое время отжига связано еще и с тем, что они использовали термоциклер PCRJet, характеризующийся очень быстрой сменой температур.

Завершая данную статью, стоит указать на работу, в которой сначала пришлось с помощью обратной транскриптазы AccuScript по превышающей 80% GC-пар мРНК строить кДНК, для чего в реакционную смесь добавляли ДМСО и бетаин в разных комбинациях [Sahdev et al., 2007]. В итоге удалось построить ДНК-матрицу и в ходе ПЦР амплифицировать в присутствии этих энхансеров ампликоны размерами 1611 и 4149 п.н.

Заключение

Как можно видеть из изложенного выше, применение различных энхансеров в целом обеспечивает амплификацию GC-богатых участков ДНК, в том числе в некоторых случаях довольно протяженных. Однако подчас данные о пользе тех или иных соединений несколько противоречивы. Это неудивительно, поскольку в каждом конкретном случае ДНК полимеразы (тоже, кстати, часто разные) строят новую цепь ДНК со своей последовательностью нуклеотидов, и простое упоминание процентного содержания GC-пар дает лишь очень грубую характеристику мишеней. Поэтому единственной рекомендацией при проведении ПЦР с использованием в качестве мишеней GC-богатых участков может быть совет опробовать различные энхансеры и/или их комбинации, чтобы достичь желаемого результата. При этом нельзя сбрасывать со счетов и оптимизацию параметров термоциклирования и состав используемого буфера и, конечно, подбирать подходящую ДНК-полимеразу.

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. Зубов В.В., Чемерис Д.А., Сахабутдинова А.Р. и др. Энхансеры ПЦР. III. Амплификация

[1] хотя упомянутые выше работы свидетельствуют об обратном

[2] а другого часто для праймеров для GC-богатых мишеней и не бывает

длинных матриц. *Biomics*. 2025. 17(2). 170-181. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2025-13
3. Сахабутдинова А.Р., Чемерис Д.А., Гарафутдинов Р.Р. Энхансеры ПЦР. V. Наноматериалы или наноПЦР. *Biomics*. 2025. 17(2). 193-205. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2025-15
4. Сахабутдинова А.Р. Чемерис Д.А., Чемерис А.В. и др. Энхансеры ПЦР. I. Общие сведения. *Biomics*. 2023. 15(3). 218-223. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2023-20
5. Чемерис А.В., Чемерис Д.А., Магданов Э.Г. и др. Причины ложно-негативной ПЦР и недопущение некоторых из них. *Biomics*. 2012. 4(1). 31-47.
6. Чемерис Д.А., Магданов Э.Г., Машков О.И. и др. ПЦР с отложенным (горячим или задержанным) стартом. *Biomics*. 2011. 2(1). 1-8.
7. Agarwal RK, Perl A. PCR amplification of highly GC-rich DNA template after denaturation by NaOH. *Nucleic Acids Res.* 1993. 21(22). 5283-5284. doi: 10.1093/nar/21.22.5283
8. Bachmann HS, Siffert W, Frey UH. Successful amplification of extremely GC-rich promoter regions using a novel 'slowdown PCR' technique. *Pharmacogenetics*. 2003. 13(12). 759-766. doi: 10.1097/00008571-200312000-00006
9. Chakrabarti R, Schutt CE. Novel sulfoxides facilitate GC-rich template amplification. *Biotechniques*. 2002. 32(4). 866, 868, 870-872, 874. doi: 10.2144/02324rr04
10. Chakrabarti R, Schutt CE. The enhancement of PCR amplification by low molecular-weight sulfones. *Gene*. 2001. 274(1-2). 293-298. doi: 10.1016/s0378-1119(01)00621-7
11. Dutton CM, Paynton C, Sommer SS. General method for amplifying regions of very high G+C content. *Nucleic Acids Res.* 1993. 21(12). 2953-2954. doi: 10.1093/nar/21.12.2953
12. Farell EM, Alexandre G. Bovine serum albumin further enhances the effects of organic solvents on increased yield of polymerase chain reaction of GC-rich templates. *BMC Res Notes*. 2012. 5. 257. doi: 10.1186/1756-0500-5-257
13. Flores-Juárez CR, González-Jasso E, Antaramian A et al. Capacity of N4-methyl-2'-deoxycytidine 5'-triphosphate to sustain the polymerase chain reaction using various thermostable DNA polymerases. *Anal Biochem*. 2013. 438(1). 73-81. doi: 10.1016/j.ab.2013.03.025
14. Flores-Juárez CR, González-Jasso E, Antaramian A et al. PCR amplification of GC-rich DNA regions using the nucleotide analog N4-methyl-2'-deoxycytidine 5'-triphosphate. *Biotechniques*. 2016. 61(4). 175-182. doi: 10.2144/000114457
15. Frey UH, Bachmann HS, Peters J et al. PCR-amplification of GC-rich regions: 'slowdown PCR'. *Nat Protoc*. 2008. 3(8). 1312-1317. doi: 10.1038/nprot.2008.112
16. Garafutdinov RR, Galimova AA, Sakhabutdinova AR. Polymerase chain reaction with nearby primers. *Anal Biochem*. 2017. 518. 126-133. doi: 10.1016/j.ab.2016.11.017
17. Henke W, Herdel K, Jung K et al. Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 1997. 25(19). 3957-3958. doi: 10.1093/nar/25.19.3957
18. Horáková H, Polakovičová I, Shaik GM et al. 1,2-propanediol-trehalose mixture as a potent quantitative real-time PCR enhancer. *BMC Biotechnol*. 2011. 11. 41. doi: 10.1186/1472-6750-11-41
19. Hubé F, Reverdiau P, Iochmann S et al. Improved PCR method for amplification of GC-rich DNA sequences. *Mol Biotechnol*. 2005. 31(1). 81-84. doi: 10.1385/MB:31:1:081
20. Kang J, Lee MS, Gorenstein DG. The enhancement of PCR amplification of a random sequence DNA library by DMSO and betaine: application to *in vitro* combinatorial selection of aptamers. *J Biochem Biophys Methods*. 2005. 64(2). 147-151. doi: 10.1016/j.jbbm.2005.06.003
21. 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
22. Liu Q, Sommer SS. Subcycling-PCR for multiplex long-distance amplification of regions with high and low GC content: application to the inversion hotspot in the factor VIII gene. *Biotechniques*. 1998. 25(6). 1022-1028. doi: 10.2144/98256rr01
23. Lotte Hansen L, Justesen J. PCR Amplification of Highly GC-Rich Regions. *CSH Protoc*. 2006. 2006(1). pdb.prot4093. doi: 10.1101/pdb.prot4093
24. Mamedov TG, Pienaar E, Whitney SE et al. A fundamental study of the PCR amplification of GC-rich DNA templates. *Comput Biol Chem*. 2008. 32(6). 452-457. doi: 10.1016/j.compbiolchem.2008.07.021
25. McConlogue L, Brow MA, Innis MA. Structure-independent DNA amplification by PCR using 7-deaza-2'-deoxyguanosine. *Nucleic Acids Res*. 1988. 16(20). 9869. doi: 10.1093/nar/16.20.9869
26. Mousavian Z, Sadeghi HM, Sabzghabaee AM et al. Polymerase chain reaction amplification of a GC rich region by adding 1,2 propanediol. *Adv Biomed Res*. 2014. 3. 65. doi: 10.4103/2277-9175.125846
27. Musso M, Bocciardi R, Parodi S et al. Betaine, dimethyl sulfoxide, and 7-deaza-dGTP, a powerful mixture for amplification of GC-rich DNA sequences. *J Mol Diagn*. 2006. 8(5). 544-550. doi: 10.2353/jmoldx.2006.060058
28. Orpana AK, Ho TH, Stenman J. Multiple heat pulses during PCR extension enabling amplification of

GC-rich sequences and reducing amplification bias. *Anal Chem.* 2012. 84(4). 2081-2087. doi: 10.1021/ac300040j
29. Ralser M, Querfurth R, Warnatz HJ et al. An efficient and economic enhancer mix for PCR. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006. 347(3). 747-751. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.06.151
30. Sahdev S, Saini S, Tiwari P et al. Amplification of GC-rich genes by following a combination strategy of primer design, enhancers and modified PCR cycle conditions. *Mol Cell Probes*. 2007. 21(4). 303-307. doi: 10.1016/j.mcp.2007.03.004
31. Sakhabutdinova AR, Chemeris AV, Garafutdinov RR. Enhancement of PCR efficiency using mono- and disaccharides. *Anal Biochem*. 2020. 606. 113858. doi: 10.1016/j.ab.2020.113858
32. Sarkar G, Kapelner S, Sommer SS. Formamide can dramatically improve the specificity of PCR. *Nucleic Acids Res*. 1990. 18(24). 7465. doi: 10.1093/nar/18.24.7465
33. Schnoor M, Voss P, Cullen P et al. Characterization of the synthetic compatible solute homoectoine as a potent PCR enhancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004. 322(3). 867-872. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.07.200
34. Schuchard M, Sarkar G, Ruesink T et al. Two-step "hot" PCR amplification of GC-rich avian c-myc sequences. *Biotechniques*. 1993. 14(3). 390-394.
35. Seifi T, Ghaedi K, Salamian A et al. Amplification of GC-rich Putative Mouse PeP Promoter using Betaine and DMSO in Ammonium Sulfate Polymerase Chain Reaction Buffer. *Avicenna J Med Biotechnol*. 2012. 4(4). 206-209.
36. Shi X, Jarvis DL. A new rapid amplification of cDNA ends method for extremely guanine plus cytosine-rich genes. *Anal Biochem*. 2006. 356(2). 222-228. doi: 10.1016/j.ab.2006.06.028
37. Shi Y, Liu YL, Lai PY et al. Ionic liquids promote PCR amplification of DNA. *Chem Commun (Camb).* 2012. 48(43). 5325-5327. doi: 10.1039/c2cc31740k
38. Shore S, Paul N. Robust PCR Amplification of GC-Rich Targets with Hot Start 7-deaza-dGTP. *BioTechniques*. 2010. 49(5). 841-843. doi: 10.2144/000113552
39. Strien J, Sanft J, Mall G. Enhancement of PCR amplification of moderate GC-containing and highly GC-rich DNA sequences. *Mol Biotechnol*. 2013. 54(3). 1048-1054. doi: 10.1007/s12033-013-9660-x
40. Turner SL, Jenkins FJ. Use of deoxyinosine in PCR to improve amplification of GC-rich DNA. *Biotechniques*. 1995. 19(1). 48-52.
41. Varadaraj K, Skinner DM. Denaturants or cosolvents improve the specificity of PCR amplification of a G + C-rich DNA using genetically engineered DNA polymerases. *Gene*. 1994. 140(1). 1-5. doi: 10.1016/0378-1119(94)90723-4
42. Wei M, Deng J, Feng K et al. Universal method facilitating the amplification of extremely GC-rich DNA fragments from genomic DNA. *Anal Chem*. 2010. 82(14). 6303-6307. doi: 10.1021/ac100797t
43. Xie B, Chen J, Wang Z et al. Sweet enhancers of polymerase chain reaction. *PLoS One*. 2024. 19(10). e0311939. doi: 10.1371/journal.pone.0311939
44. Yang Z, Yang J, Yue L et al. Enhancement Effects and Mechanism Studies of Two Bismuth-Based Materials Assisted by DMSO and Glycerol in GC-Rich PCR. *Molecules*. 2023. 28(11). 4515. doi: 10.3390/molecules28114515
45. Zhang Z, Kermekchiev MB, Barnes WM. Direct DNA amplification from crude clinical samples using a PCR enhancer cocktail and novel mutants of Taq. *J Mol Diagn*. 2010. 12(2). 152-161. doi: 10.2353/jmoldx.2010.090070
46. Zhang Z, Yang X, Meng L et al. Enhanced amplification of GC-rich DNA with two organic reagents. *Biotechniques*. 2009. 47(3). 775-779. doi: 10.2144/000113203

References

1. Agarwal RK, Perl A. PCR amplification of highly GC-rich DNA template after denaturation by NaOH. *Nucleic Acids Res.* 1993. 21(22). 5283-5284. doi: 10.1093/nar/21.22.5283
2. Bachmann HS, Siffert W, Frey UH. Successful amplification of extremely GC-rich promoter regions using a novel 'slowdown PCR' technique. *Pharmacogenetics*. 2003. 13(12). 759-766. doi: 10.1097/00008571-200312000-00006
3. Chakrabarti R, Schutt CE. Novel sulfoxides facilitate GC-rich template amplification. *Biotechniques*. 2002. 32(4). 866, 868, 870-872, 874. doi: 10.2144/02324rr04
4. Chakrabarti R, Schutt CE. The enhancement of PCR amplification by low molecular-weight sulfones. *Gene*. 2001. 274(1-2). 293-298. doi: 10.1016/s0378-1119(01)00621-7
5. Chemeris AV, Chemeris DA, Magdanov EG et al. Causes of false-negative PCR and how to avoid some of them. *Biomics*. 2012. 4(1). 31-47. (In Russian)
6. Chemeris DA, Magdanov EG, Mashkov OI et al. Hot start or time-release PCR. *Biomics*. 2011. 2(1). 1-8. (In Russian)
7. Dutton CM, Paynton C, Sommer SS. General method for amplifying regions of very high G+C content. *Nucleic Acids Res.* 1993. 21(12). 2953-2954. doi: 10.1093/nar/21.12.2953
8. Farell EM, Alexandre G. Bovine serum albumin further enhances the effects of organic solvents on increased yield of polymerase chain reaction of GC-rich

templates. *BMC Res Notes*. 2012. 5. 257. doi: 10.1186/1756-0500-5-257
9. Flores-Juárez CR, González-Jasso E, Antaramian A et al. Capacity of N4-methyl-2'-deoxycytidine 5'-triphosphate to sustain the polymerase chain reaction using various thermostable DNA polymerases. *Anal Biochem*. 2013. 438(1). 73-81. doi: 10.1016/j.ab.2013.03.025
10. Flores-Juárez CR, González-Jasso E, Antaramian A et al. PCR amplification of GC-rich DNA regions using the nucleotide analog N4-methyl-2'-deoxycytidine 5'-triphosphate. *Biotechniques*. 2016. 61(4). 175-182. doi: 10.2144/000114457
11. Frey UH, Bachmann HS, Peters J et al. PCR-amplification of GC-rich regions: 'slowdown PCR'. *Nat Protoc*. 2008. 3(8). 1312-1317. doi: 10.1038/nprot.2008.112
12. Garafutdinov RR, Chemeris DA, Sakhabutdinova AR et al. PCR enhancers. II. Chemical and biological substances. *Biomics*. 2025. 17(2). 157-169. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2025-12 (In Russian)
13. Garafutdinov RR, Galimova AA, Sakhabutdinova AR. Polymerase chain reaction with nearby primers. *Anal Biochem*. 2017. 518. 126-133. doi: 10.1016/j.ab.2016.11.017
14. Henke W, Herdel K, Jung K et al. Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 1997. 25(19). 3957-3958. doi: 10.1093/nar/25.19.3957
15. Horáková H, Polakovičová I, Shaik GM et al. 1,2-propanediol-trehalose mixture as a potent quantitative real-time PCR enhancer. *BMC Biotechnol*. 2011. 11. 41. doi: 10.1186/1472-6750-11-41
16. Hubé F, Reverdiau P, Iochmann S et al. Improved PCR method for amplification of GC-rich DNA sequences. *Mol Biotechnol*. 2005. 31(1). 81-84. doi: 10.1385/MB:31:1:081
17. Kang J, Lee MS, Gorenstein DG. The enhancement of PCR amplification of a random sequence DNA library by DMSO and betaine: application to in vitro combinatorial selection of aptamers. *J Biochem Biophys Methods*. 2005. 64(2). 147-151. doi: 10.1016/j.jbbm.2005.06.003
18. 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
19. Liu Q, Sommer SS. Subcycling-PCR for multiplex long-distance amplification of regions with high and low GC content: application to the inversion hotspot in the factor VIII gene. *Biotechniques*. 1998. 25(6). 1022-1028. doi: 10.2144/98256rr01
20. Lotte Hansen L, Justesen J. PCR Amplification of Highly GC-Rich Regions. *CSH Protoc*. 2006. 2006(1). pdb.prot4093. doi: 10.1101/pdb.prot4093
21. Mamedov TG, Pienaar E, Whitney SE et al. A fundamental study of the PCR amplification of GC-rich DNA templates. *Comput Biol Chem*. 2008. 32(6). 452-457. doi: 10.1016/j.compbiolchem.2008.07.021
22. McConlogue L, Brow MA, Innis MA. Structure-independent DNA amplification by PCR using 7-deaza-2'-deoxyguanosine. *Nucleic Acids Res*. 1988. 16(20). 9869. doi: 10.1093/nar/16.20.9869
23. Mousavian Z, Sadeghi HM, Sabzghabaee AM et al. Polymerase chain reaction amplification of a GC rich region by adding 1,2 propanediol. *Adv Biomed Res*. 2014. 3. 65. doi: 10.4103/2277-9175.125846
24. Musso M, Bocciardi R, Parodi S et al. Betaine, dimethyl sulfoxide, and 7-deaza-dGTP, a powerful mixture for amplification of GC-rich DNA sequences. *J Mol Diagn*. 2006. 8(5). 544-550. doi: 10.2353/jmoldx.2006.060058
25. Orpana AK, Ho TH, Stenman J. Multiple heat pulses during PCR extension enabling amplification of GC-rich sequences and reducing amplification bias. *Anal Chem.* 2012. 84(4). 2081-2087. doi: 10.1021/ac300040j
26. Ralser M, Querfurth R, Warnatz HJ, Lehrach H, Yaspo ML, Krobitsch S. An efficient and economic enhancer mix for PCR. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006. 347(3). 747-751. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.06.151
27. Sahdev S, Saini S, Tiwari P et al. Amplification of GC-rich genes by following a combination strategy of primer design, enhancers and modified PCR cycle conditions. *Mol Cell Probes*. 2007. 21(4). 303-307. doi: 10.1016/j.mcp.2007.03.004
28. Sakhabutdinova AR, Chemeris AV, Garafutdinov RR. Enhancement of PCR efficiency using mono- and disaccharides. *Anal Biochem*. 2020. 606. 113858. doi: 10.1016/j.ab.2020.113858
29. Sakhabutdinova AR, Chemeris DA, Chemeris AV et al. PCR enhancers. I. General information. *Biomics*. 2023. 15(3). 218-223. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2023-20 (In Russian)
30. Sakhabutdinova AR, Chemeris DA, Garafutdinov RR. Enhancers of PCR. V. Nanomaterials or nanoPCR. *Biomics*. 2025. 17(2). 193-205. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2025-15 (In Russian)
31. Sarkar G, Kapelner S, Sommer SS. Formamide can dramatically improve the specificity of PCR. *Nucleic Acids Res*. 1990. 18(24). 7465. doi: 10.1093/nar/18.24.7465
32. Schnoor M, Voss P, Cullen P et al. Characterization of the synthetic compatible solute homoectoine as a potent PCR enhancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004. 322(3). 867-672. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.07.200

33. Schuchard M, Sarkar G, Ruesink T et al. Two-step "hot" PCR amplification of GC-rich avian c-myc sequences. *Biotechniques*. 1993. 14(3). 390-394.
34. Seifi T, Ghaedi K, Salamian A et al. Amplification of GC-rich Putative Mouse PeP Promoter using Betaine and DMSO in Ammonium Sulfate Polymerase Chain Reaction Buffer. *Avicenna J Med Biotechnol*. 2012. 4(4). 206-209.
35. Shi X, Jarvis DL. A new rapid amplification of cDNA ends method for extremely guanine plus cytosine-rich genes. *Anal Biochem*. 2006. 356(2). 222-228. doi: 10.1016/j.ab.2006.06.028
36. Shi Y, Liu YL, Lai PY et al. Ionic liquids promote PCR amplification of DNA. *Chem Commun (Camb).* 2012. 48(43). 5325-5327. doi: 10.1039/c2cc31740k
37. Shore S, Paul N. Robust PCR Amplification of GC-Rich Targets with Hot Start 7-deaza-dGTP. *BioTechniques*. 2010. 49(5). 841-843. doi: 10.2144/000113552
38. Strien J, Sanft J, Mall G. Enhancement of PCR amplification of moderate GC-containing and highly GC-rich DNA sequences. *Mol Biotechnol*. 2013. 54(3). 1048-1054. doi: 10.1007/s12033-013-9660-x
39. Turner SL, Jenkins FJ. Use of deoxyinosine in PCR to improve amplification of GC-rich DNA. *Biotechniques*. 1995. 19(1). 48-52.
40. Varadaraj K, Skinner DM. Denaturants or cosolvents improve the specificity of PCR amplification of a G + C-rich DNA using genetically engineered DNA polymerases. *Gene*. 1994. 140(1). 1-5. doi: 10.1016/0378-1119(94)90723-4
41. Wei M, Deng J, Feng K et al. Universal method facilitating the amplification of extremely GC-rich DNA fragments from genomic DNA. *Anal Chem*. 2010. 82(14). 6303-6307. doi: 10.1021/ac100797t
42. Xie B, Chen J, Wang Z et al. Sweet enhancers of polymerase chain reaction. *PLoS One*. 2024. 19(10). e0311939. doi: 10.1371/journal.pone.0311939
43. Yang Z, Yang J, Yue L et al. Enhancement Effects and Mechanism Studies of Two Bismuth-Based Materials Assisted by DMSO and Glycerol in GC-Rich PCR. *Molecules*. 2023. 28(11). 4515. doi: 10.3390/molecules28114515
44. Zhang Z, Kermekchiev MB, Barnes WM. Direct DNA amplification from crude clinical samples using a PCR enhancer cocktail and novel mutants of Taq. *J Mol Diagn*. 2010. 12(2). 152-161. doi: 10.2353/jmoldx.2010.090070
45. Zhang Z, Yang X, Meng L et al. Enhanced amplification of GC-rich DNA with two organic reagents. *Biotechniques*. 2009. 47(3). 775-779. doi: 10.2144/000113203
46. Zubov VV, Chemeris DA, Sakhabutdinova AR et al. Enhancers of PCR. III. Amplification of long templates. *Biomics*. 2025. 17(2). 170-181. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2025-13 (In Russian)