



УДК 577.2.08

АМПЛИФИКАЦИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ “КАТЯЩИМСЯ КОЛЬЦОМ” – УНИВЕРСАЛЬНЫЙ МЕТОД АНАЛИЗА ШИРОКОГО КРУГА БИОЛОГИЧЕСКИХ МИШЕНЕЙ¹

© 2021 г. Р. Р. Гарафутдинов*, #, А. Р. Сахабутдинова*, А. Р. Гильванов*, А. В. Чемерис*

*Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, Россия, 450054 Уфа, просп. Октября, 71

Поступила в редакцию 26.03.2021 г.

После доработки 14.04.2021 г.

Принята к публикации 16.04.2021 г.

Обнаружение и количественное определение биомишеней – важная аналитическая задача, для решения которой используется широкий спектр различных методов. В последнее время значительное развитие получили методы, основанные на изотермической амплификации нуклеиновых кислот (НК). Среди них особое место занимает амплификация “катящимся кольцом” (АКК), которая используется не только для обнаружения специфических НК, но и для анализа других биомолекул, а также представляет собой универсальную платформу для разработки высокочувствительных методов и удобных диагностических устройств. В настоящем обзоре раскрыт ряд методических аспектов АКК-опосредованного анализа, в частности приведены данные о его ключевых молекулярных участниках, описаны способы повышения эффективности и производительности АКК, кратко охарактеризованы разновидности используемых репортерных систем. Показаны различия в технике АКК-опосредованного анализа биомишеней разных типов. Приведены отдельные примеры использования различных вариантов АКК для решения конкретных диагностических задач.

Ключевые слова: изотермическая амплификация, амплификация “катящимся кольцом”, С-проба, кольцевая матрица, аналит, нуклеиновые кислоты, микроРНК, белки

DOI: 10.31857/S0132342321060075

ВВЕДЕНИЕ

Амплификация нуклеиновых кислот (НК) *in vitro* – основа современных методов молекулярной диагностики различных заболеваний, анализа пищевых продуктов, биологических следов и объектов из окружающей среды. Из множества способов амплификации наибольшее применение получила полимеразная цепная реакция (ПЦР) [1], однако необходимость циклического изменения температуры реакционной смеси обуславливает зависимость ПЦР от дорогостоящего оборудования, что ограничивает ее применимость, особенно в “полевых” условиях. Альтернативой ПЦР служат изотермические методы, та-

кие как амплификация смещением цепи – SDA (Strand-Displacement Amplification), амплификация “катящимся кольцом” – АКК (Rolling Circle Amplification, RCA), петлевая изотермическая амплификация – LAMP (Loop-mediated AMPlification) и др. [2, 3]. В этих методах используются полимеразы с цепь-вытесняющей активностью, обеспечивающие денатурацию двухцепочечных НК в ходе полимеризации, благодаря чему отпадает необходимость циклирования этапов денатурации, отжига и элонгации, а для осуществления реакции достаточно термостата.

Среди изотермических методов АКК занимает особое место: это единственная реакция, позволяющая синтезировать НК-продукты с желаемой (искусственно задаваемой) нуклеотидной последовательностью. Характерная особенность АКК – использование кольцевых НК-матриц, при соответствующем дизайне которых становятся возможными комбинирование с другими ферментативными реакциями, различными репортерными системами, проведение биоанализа в растворе, на поверхности твердых материалов или в живых клетках, а также перевод в высокопроизводительные форматы. В отличие от всех остальных спосо-

¹ Статья победителей конкурса РФФИ “Экспансия”, 2020 г. (грант № 20-14-50120).

Сокращения: АКК – амплификация “катящимся кольцом”; ДНКзим – дезоксирибозим; КМ – кольцевая матрица; НК – нуклеиновые кислоты; НЧЗ – наночастицы золота; ПАКК – протяженный одноцепочечный продукт АКК; ПЦР – полимеразная цепная реакция; ТКК – транскрипция “катящимся кольцом”; ФВС – функционально активная вторичная структура; SDA – амплификация смещением цепи; SNP – однонуклеотидный полиморфизм.

Автор для связи: (тел.: +7 (347) 235-60-88; эл. почта: garafutdinovr@gmail.com).

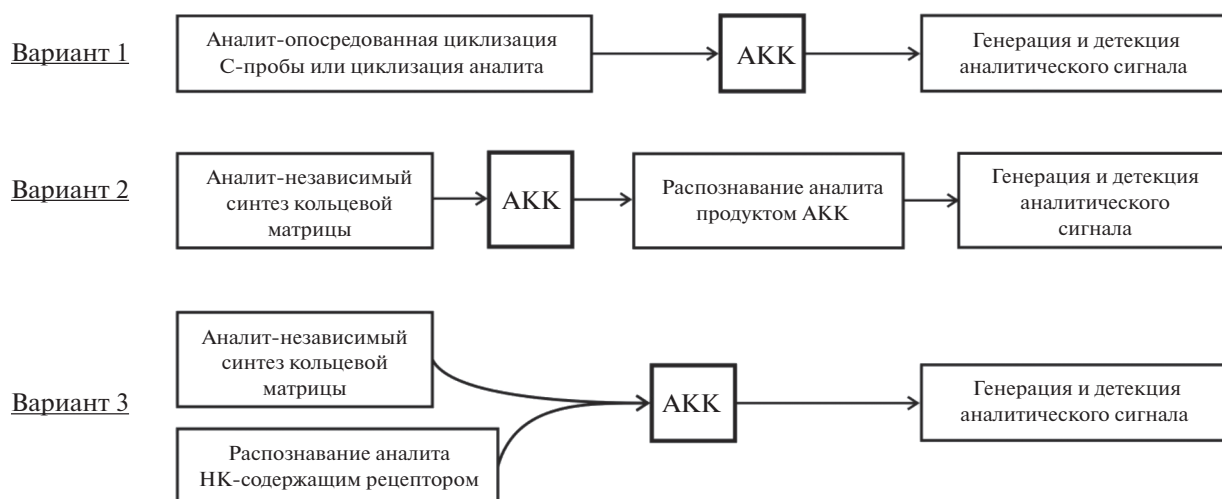


Рис. 1. Варианты включения амплификации “катящимся кольцом” как отдельного этапа в протокол биоаналитического исследования.

бов амплификации, АКК может использоваться не только как способ размножения и последующей детекции молекул аналита – нуклеиновых кислот, но и как инструмент для получения функционально активных НК, опосредующих обнаружение иных биомишеней. Универсальность АКК обусловила разработку множества разнообразных методов биоанализа, нашедших отражение в огромном количестве научных публикаций и послуживших основой для создания портативных микрофлюидных, электрохимических и биосенсорных диагностических устройств [4–7]. Несмотря на широкие возможности, АКК находит практическое применение в первую очередь в молекулярной диагностике, обеспечивая высокую чувствительность и специфичность обнаружения таких биоаналитов, как нуклеиновые кислоты и белки. В настоящем обзоре представлены молекулярные основы метода АКК и показано его применение для анализа биомишеней разной химической природы.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ АМПЛИФИКАЦИИ “КАТЯЩИМСЯ КОЛЬЦОМ”

Амплификация “катящимся кольцом” – это реакция синтеза нуклеиновых кислот на кольцевой матрице. АКК как метод увеличения количества аналита используется только в отношении НК, в остальных случаях реакцию совмещают с распознаванием биомишени специфическим рецептором. В зависимости от природы аналита (НК, белок, малая органическая молекула), особенностей анализируемого образца (происхождение, аналитическая чистота, наличие совместно выделяющихся веществ и проч.) и используемого

инструментария, АКК в качестве отдельного, самостоятельного этапа может занимать разное положение в биоаналитическом протоколе. Можно выделить три варианта использования данной реакции амплификации в анализе (рис. 1).

Вариант 1, применяемый при анализе нуклеиновых кислот, включает АКК как этап амплификации или непосредственно мишени, или кольцевой матрицы, полученной с ее участием. По варианту 2 аналит распознается с помощью продуктов АКК, формирующих функционально активные вторичные структуры (ФВС), а для проведения реакции используют предварительно синтезированную кольцевую матрицу. Этот путь, обеспечивающий повышение концентрации аналитического агента, универсален и реализуется для широкого круга биомишеней. Согласно варианту 3, аналит распознается с помощью рецептора, связанного с НК, которая, как правило, выступает праймером для АКК или НК-захватывающим зондом. Данный путь используется чаще всего в технологиях твердофазного анализа, когда осуществляют фиксацию аналита на подложке и проводят реакции синтеза, расщепления или гибридизации НК у поверхности твердой фазы.

Специфичность АКК-анализа определяется типом аналита и технологией его обнаружения. В целом бóльшую специфичность обеспечивают подходы, в которых реакция АКК приводит к повышению концентрации аналитического агента и/или усилению аналитического сигнала. Многие предложенные на сегодня методы АКК-анализа характеризуются высокой чувствительностью с пределами обнаружения в среднем на уровне фемтомолярных (для НК) и пикомолярных (для белков) концентраций.

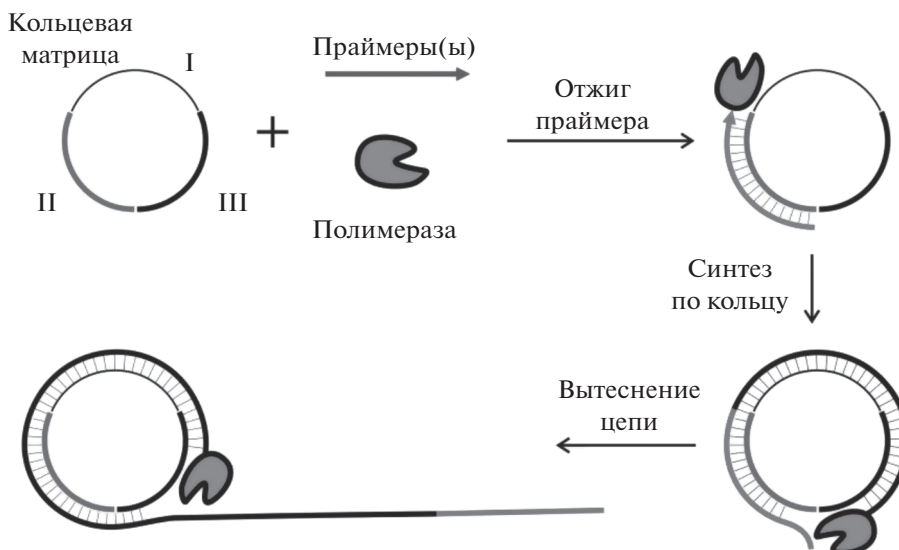


Рис. 2. Ключевые компоненты реакционной системы и протекание АКК. Для кольцевой матрицы разными зонами выделены мотивы, ответственные за связывание с мишенью (I), с праймером (II) и за образование ФВС продуктом АКК (III).

Ключевые компоненты реакционных систем для АКК. Ключевыми участниками АКК выступают одноцепочечная кольцевая матрица (КМ), как минимум один праймер, отжигающийся на КМ (“затравочный” праймер), и полимераза с цепьвытесняющей активностью (рис. 2) [8]. КМ может содержать несколько разных олигонуклеотидных мотивов, ответственных, например, за связывание с мишенью (I), с праймером (II) и за образование ФВС продуктом АКК (III).

После отжига праймера на КМ начинается синтез ее комплементарной копии, который продолжается до тех пор, пока полимераза не дойдет до 5'-конца праймера. Далее фермент вытесняет мешающую ему цепь и продолжает синтез по кольцу, делая множество оборотов и нарабатывая протяженный одноцепочечный продукт АКК (далее – ПАКК), длина которого может составлять десятки, сотни и даже тысячи тандемных повторов в зависимости от процессивности фермента [8, 9].

АКК осуществима не только с кольцевыми ДНК-, но и с РНК-матрицами [9]. В последнем случае реакцию чаще называют транскрипцией “катящимся кольцом” (ТКК), по своей сути – это разновидность АКК, поскольку для нее характерны те же базовые признаки и параметры, что и для АКК с использованием ДНК-матриц. Единственное существенное отличие заключается в применении РНК-зависимых полимераз, и инициация транскрипции может требовать наличия промоторных последовательностей, что накладывает ограничения при дизайне КМ и праймеров.

Как правило, кольцевые матрицы получают из олигонуклеотидов-предшественников, называемых С-проба (С-probe, padlock), путем циклизации их с помощью ДНК- или РНК-лигазы или посредством химического лигирования. В качестве С-проб обычно используют линейные ДНК или РНК протяженностью ~40–60 нт, однако имеются данные о замыкании как коротких (от 13 нт при химическом лигировании и от 25 нт при ферментативном лигировании), так и относительно протяженных (до 105 нт) олигонуклеотидов [9]. Циклизация НК может осуществляться матричным и нематричным способами. Первый вариант, схематично изображенный на рис. 3а, заключается в отжиге С-пробы на так называемой “поддерживающей матрице” (splint); в этом случае С-проба имеет по обоим концам нуклеотидные последовательности протяженностью 10–20 нт, комплементарные поддерживающей матрице [10]. Более короткие участки отжига (суммарно <15 нт) снижают устойчивость формирующейся дуплексной структуры, а протяженные повышают эффективность межмолекулярного взаимодействия, приводящего к образованию линейных продуктов [11]. Отожженные концы С-пробы конструируют таким образом, чтобы они располагались “встык” друг к другу и образовывали ник. В случае анализа НК-мишени в качестве поддерживающей матрицы часто выступает непосредственно детектируемая НК.

Матричный синтез КМ чаще всего проводят с помощью Т4 ДНК-лигазы, однако при анализе РНК используют лигазы с меньшей субстратной специфичностью, например, ДНК-лигазу вируса хлореллы (коммерческая лигаза SplintR) или Т4

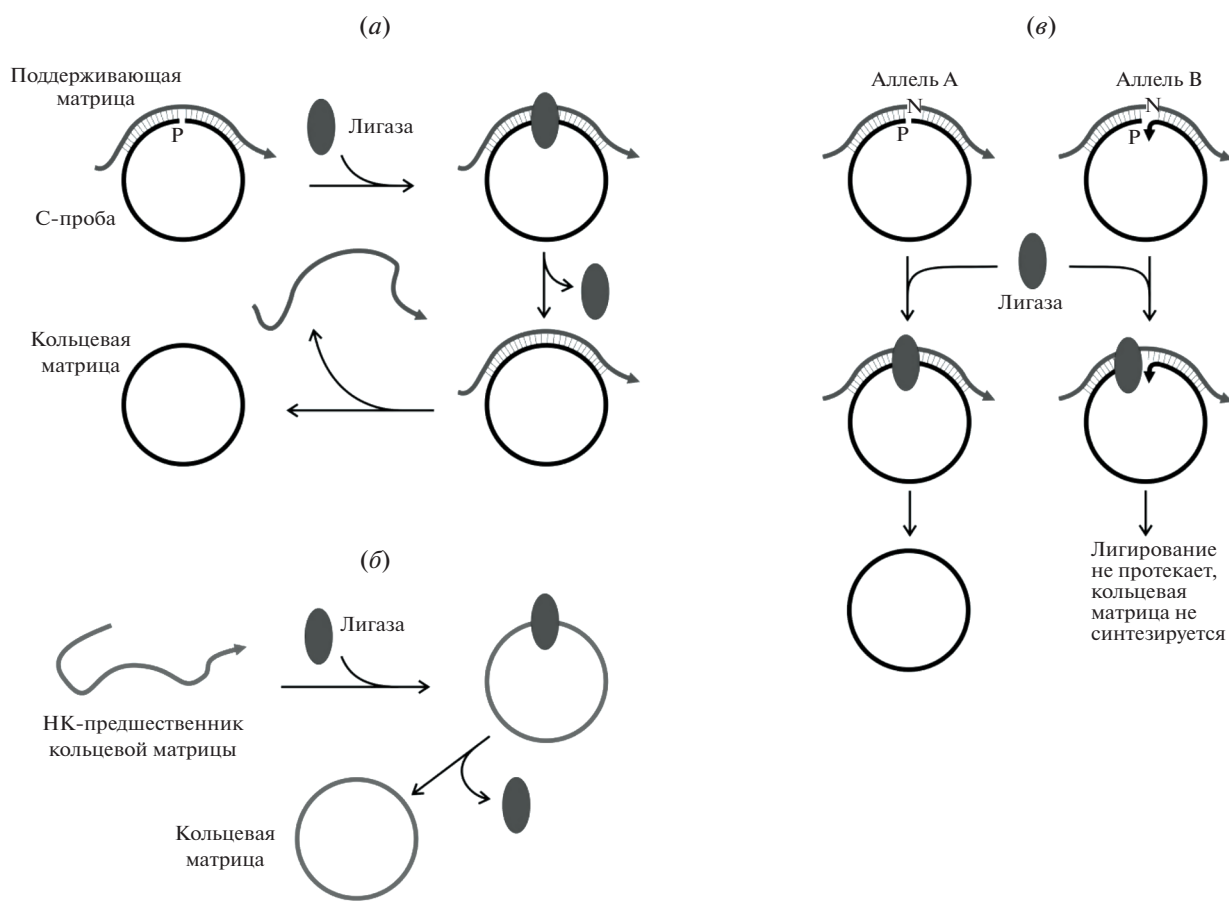


Рис. 3. Схема замыкания С-пробы с поддерживающей матрицей (а) и без нее (б), дискриминация полиморфных нуклеотидов с помощью аллель-специфичных С-проб при анализе однонуклеотидного полиморфизма (в).

РНК-лигазы [12, 13]. Нематричное лигирование не требует присутствия поддерживающей матрицы; его осуществляют с помощью T4 РНК-лигаз или CircLigase (рис. 3б). Хотя нематричное лигирование обеспечивает низкий выход целевого продукта, данный способ незаменим при изучении образцов НК неопределенного состава и при анализе короткоцепочечных НК, например, фрагментированной ДНК или малых РНК. Кроме того, известны способы повышения выхода КМ при лигировании за счет использования агентов молекулярного краудинга, таких как полиэтиленгликоль [14, 15].

Циклизация НК химическим способом в отдельных случаях — более удобная альтернатива лигазам, однако она требует использования дополнительных реагентов или модифицированных С-проб. Первые способы замыкания олигонуклеотидов заключались в конденсации 5'-концевого фосфата и 3'-гидроксигруппы под действием карбодимида или бромциана [16], 5'-концевого иодтимидина с 3'-фосфотиоатом [17] или за счет 5'-O-тозильной группы [18]. Позднее были предложены подходы, основанные на методах клик-

химии [19], в первую очередь азид-алкиновом циклоприсоединении [20].

Размер КМ оказывает значительное влияние на эффективность АКК. Небольшие НК-кольца (<40 нт), по-видимому, мало пригодны для проведения этой реакции [14], хотя имеются единичные данные о возможности их использования для амплификации [9]. Для КМ, не превышающих в линейном двухцепочечном виде одну персистентную длину ДНК (~51 нм или ~160 п.н. для двухцепочечной ДНК в В-форме [21]), показано, что эффективность АКК коррелирует с количеством витков двойной спирали: для колец, имеющих целочисленное количество витков, наблюдается наименьшая эффективность амплификации, тогда как для колец с нецелочисленным количеством — наивысшая [22]. Для КМ, близких по размерам к плазидам, эффективность АКК существенно снижена [23].

Нуклеотидная последовательность КМ может быть задана таким образом, что отдельные ее участки отжигаются в пределах кольца, образуя вторичные структуры типа петли или «гантели» (dumbbell), способствующие повышению эффек-

тивности циклизации С-пробы и обуславливающие наличие в ПАКК двухцепочечных фрагментов. В зависимости от используемой после АКК системы детекции результатов, в структуру С-пробы могут быть включены последовательности, обеспечивающие образование ФВС (аптамеров, дезоксирибозимов, G-квадруплексов, петель и др.) или несущие сайты распознавания эндонуклеаз, участки для отжига специфических гибридационных зондов или гомонуклеотидные мотивы для связывания с металлическими наночастицами. Обнаружено также, что КМ с высоким содержанием нуклеотидов dA и dC повышают эффективность амплификации по кольцу [24].

АКК возможна только под действием полимераз с цепь-вытесняющей активностью. В этом случае фермент обеспечивает расхождение цепей НК и катализирует синтез новой цепи за счет вытеснения старой по мере продвижения по матрице. Выбор подобных полимераз достаточно широк, но наибольшее распространение получили ДНК-полимеразы Bst, Bsm и Vent без 5'-3'-экзонуклеазной активности, phi29, T7 РНК-полимераза и др. ДНК-полимераза phi29 обладает чрезвычайно высокой процессивностью, однако имеет слишком низкие оптимум активности и температуру инактивации (30 и 65°C соответственно). Большой фрагмент ДНК-полимеразы I из *Geobacillus stearothermophilus* (Bst exo-) — это относительно термостабильный (температурный оптимум 60–65°C) и процессивный фермент. Доступны его мутантные формы (например, Bst 2.0, Bst 2.0 Warm Start, Bst 3.0 компании New England Biolabs, США, <https://international.neb.com>), обладающие большей устойчивостью к действию ингибиторов и обеспечивающие большую скорость амплификации. Вариант Bst 3.0 обладает также активностью обратной транскриптазы. Vent exo- термостабильна, имеет высокий температурный максимум активности (75°C) и обладает процессивностью, сравнимой с Taq ДНК-полимеразой. РНК-полимераза бактериофага T7 применяется для проведения ТКК, однако требует наличия промоторных последовательностей или матрицы с повышенным содержанием пиримидиновых оснований. В то же время незначительное изменение в содержании ионов магния и рибонуклеотидтрифосфатов меняет ее субстратную специфичность [25]. Описано также использование обратных транскриптаз для проведения ТКК [26]. К сожалению, существенный недостаток наиболее популярной ДНК-полимеразы Bst exo- — способность наряду с синтезом специфического продукта реакции приводить к образованию неспецифических продуктов [27, 28]. По-видимому, аналогичным свойством обладают и прочие термостабильные полимеразы с цепь-вытесняющей активностью (собственные неопубликованные данные). Данная особенность обуславливает получение ложных результатов

или их неверную интерпретацию. Например, Yang et al. [29] предлагают новый механизм протекания амплификации, так называемую “скачкообразную” АКК, для объяснения наработки продуктов, характерных для АКК, но образовавшихся в отсутствие КМ. Ранее было предложено несколько способов предотвращения побочных реакций амплификации, протекающих под действием ДНК-полимеразы Bst exo- [30–32].

Способы повышения эффективности и производительности АКК. Изначально АКК рассматривалась как реакция удлинения единичного праймера, дающего только один длинный одноцепочечный продукт. В этом случае реакцию называют линейной АКК, а накопление продуктов носит арифметический характер, поскольку количество матриц, инициирующих амплификацию, остается постоянным. Чувствительность подходов, основанных на линейной АКК, низка и часто не позволяет осуществлять диагностически значимую детекцию биоаналита. Для повышения эффективности реакции используют более одного праймера. Вариант с отжигом на КМ сразу нескольких праймеров получил название мультипраймерная АКК (рис. 4а); его применение оправдано для относительно больших КМ (например, плазмид) с целью получения их копий для последующего секвенирования [33]. При использовании второго праймера, отжигающегося на одноцепочечном продукте удлинения первого, коэффициент размножения ампликонов увеличивается, реакция начинает носить экспоненциальный характер за счет постоянного вытеснения синтезированных цепей, многократного отжига и удлинения обоих праймеров (рис. 4б). Такой вариант АКК, называемый “сверхветвящаяся АКК”, или рамификация (hyperbranched RCA, ramification) [34], получил наибольшее распространение. В 2004 г. была разработана [35] и позднее усовершенствована [36] АКК “от кольца к кольцу” (Circle-to-Circle Amplification, C2CA), которая включает повторяющиеся циклы репликации КМ, расщепления ПАКК с помощью рестриктаз, получения и репликации новых КМ (рис. 4в). Murakami et al. предложили АКК, сопровождающуюся “генерацией праймеров” [37], которая основана на расщеплении ПАКК никазой и использовании дополнительной КМ (рис. 4г). Внешение ников в ПАКК приводит к увеличению количества 3'-концов, способных подвергаться удлинению полимеразой [38]. Для всех вариантов АКК с несколькими праймирующими последовательностями наиболее употребляемым стал термин “экспоненциальная АКК”.

Для повышения специфичности и производительности АКК-анализа, а также расширения спектра инструментальных методов, применимых для регистрации его результатов, были разработаны варианты амплификации на твердой по-

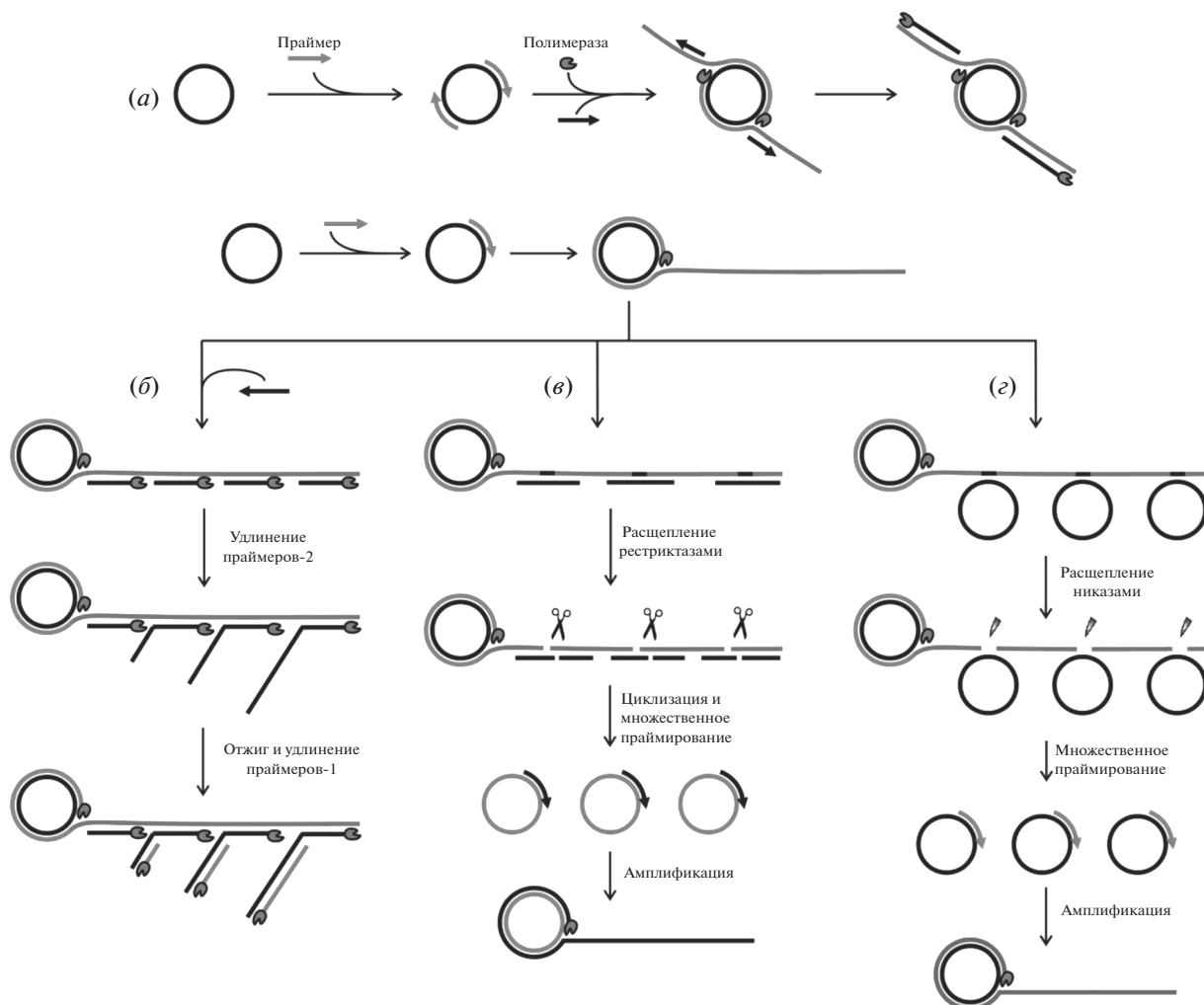


Рис. 4. Схемы протекания различных вариантов АКК с несколькими праймерами: мультипраймерная АКК (а), рамификация (б), амплификация “от кольца к кольцу” (в), АКК с генерацией праймеров (г).

верхности (“твердофазная АКК”). Для этого на подложке фиксируют один из НК-компонентов реакционной системы: праймер, поддерживающую матрицу или ДНК-пробу для распознавания мишени. В зависимости от метода анализа, иммобилизацию биомолекул осуществляют на поверхности стекла (формат микрочипов [39]), полимерных материалов (мембраны [40] и микроканалы [5, 41]), благородных металлов, графита (электрохимические биосенсоры [6, 7] и спектроскопия поверхностного плазмонного резонанса [42]). Химия иммобилизации определяется материалом подложки; как правило, закрепление биомолекул проводят путем образования ковалентных связей при взаимодействии функциональных групп или атомов поверхности и иммобилизуемой молекулы (COOH-, NH₂-, HS-, СНО-группы, поверхностные атомы металлов и др.) или за счет аффинного взаимодействия

(системы биотин–стрептавидин, дигоксигенин–антитело, антиген–антитело и др.). Для повышения загрузки поверхность функционализируют дендримерными структурами [43].

АКК в формате микрочипов обеспечивает параллельный анализ множества образцов, превосходящий по производительности мультиплекс-анализы в микропробирках [39]. Закрепление НК-компонентов реакционных систем на поверхности магнитных микрочастиц позволяет осуществлять с помощью внешнего магнита либо селективное выделение исследуемого анализата и/или его транспортировку в зону реакции, или транспортировку продуктов АКК в зону регистрации аналитического сигнала [44], а при фиксации на проводящих поверхностях – использовать электрохимические методы анализа [4–6]. Технологии, включающие “твердофазную АКК”, характеризуются значительным разнообразием, и

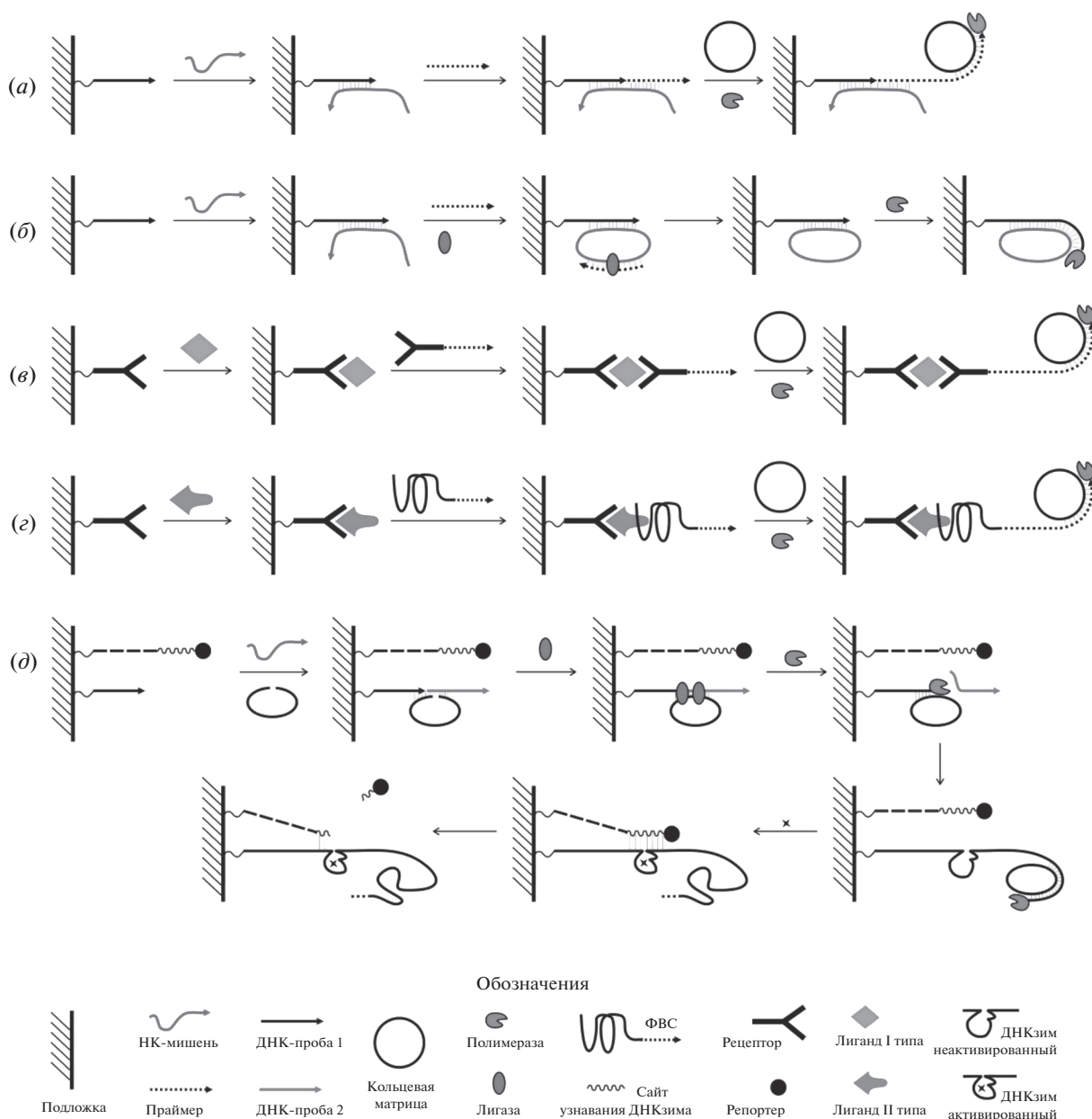




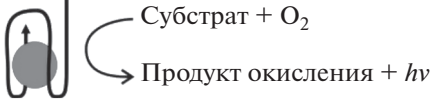
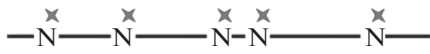

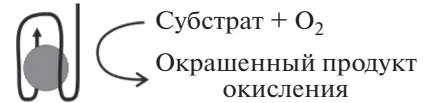

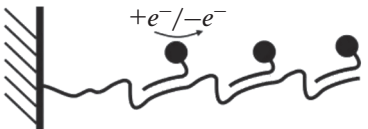
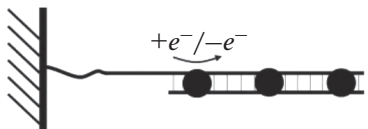
Рис. 5. Наиболее популярные варианты “твердофазной” АКК: (а) – захват НК-мишени иммобилизованной ДНК-пробой, мишень-опосредованное лигирование пробы с праймером и запуск АКК; (б) – захват НК-мишени иммобилизованной ДНК-пробой, циклизация НК-мишени и запуск АКК; (в) – распознавание биомишени, отличной от НК, иммобилизованным рецептором, образование сэндвич-комплекса с конъюгатом рецептора с праймером и запуск АКК; (г) – распознавание биомишени, отличной от НК, иммобилизованным рецептором и ФВС, несущей праймер, и запуск АКК; (д) – один из вариантов совмещения АКК с технологией “ДНК-ходоков” [45].

большинство из них представляют собой сложные каскадные процессы, сочетающие этапы распознавания биомишени, конкурентного отжига НК-структур, получение КМ, АКК, генерацию аналитического сигнала и др. (рис. 5).

Вследствие стерических затруднений ферментативные процессы у поверхности протекают с меньшей эффективностью, поэтому недавно для повышения коэффициента размножения ампли-

конов была предложена новая стратегия, заключающаяся в совмещении АКК с технологией так называемых “ДНК-ходоков” (DNA walker). Для этого на подложке закрепляют два или более типа ДНК-проб, одна из которых распознает исследуемую НК, остальные участвуют в генерации аналитического сигнала. После фиксации НК пробой № 1 на поверхности запускается каскад из повторяющихся событий денатурации–отжига

Таблица 1. Способы генерации аналитического сигнала, широко используемые в АКК-анализе

Вид сигнала	Репортер	Принцип функционирования	Ссылки
1) Флуоресцентный	а) Интеркалирующие красители		[48, 49]
	б) Флуоресцентные гибридизационные зонды		[50, 51]
	в) Флуорогенный субстрат		[52–57]
	г) Флуоресцентные нуклеотиды		[58–62]
	д) Наночастицы металлов и металлокомплексы		[63]
2) Колориметрический	а) Хромогенный субстрат		[64–66]
	б) Колориметрические гибридизационные зонды		[67]
3) Электрохимический	а) Гибридизационные зонды с электроактивной или проводящей меткой		[45, 46, 68, 69]
	б) НК-связывающие электроактивные частицы		[45, 70]

НК-структур и ферментативных реакций, приводящих к синтезу ПАКК [45–47].

Детекция результатов АКК-анализа. Совместимость АКК с различными репортерными системами обуславливает возможность детекции результатов с помощью широкого спектра инструментальных методов как по конечной точке, так и в реальном времени. Первыми способами регистрации продуктов АКК стали гель-электрофорез и применение интеркалирующих красителей и флуоресцентных гибридизационных зондов, в том числе функционирующих за счет FRET-эффекта (FRET – резонансный перенос энергии флуоресценции). Перевод АКК в твердофазный формат и использование микро- и наноразмерных структур (магнитных частиц, квантовых точек, наночастиц металлов и др.) сделало возможным применение электрохимических, спектроскопических, акустических и оптических методов. В табл. 1 приведены

наиболее используемые репортерные системы и принципы их функционирования.

Как и в большинстве амплификационных методов, измерение флуоресценции – самый популярный способ регистрации результатов АКК-анализа. Для получения флуоресцентного сигнала используют различные приемы; наиболее применяемыми остаются добавление в реакционные смеси интеркалирующих красителей (SYBR Green I, тиюфлавин Т, порфирины и др.), флуоресцентных гибридизационных зондов или окисление флуорогенного субстрата (табл. 1). Хотя использование интеркалирующих красителей – это весьма удобный вариант детекции продуктов АКК, он, к сожалению, характеризуется невысокой специфичностью. Более достоверный результат получают при использовании флуоресцентных зондов – олигонуклеотидов, содержащих в молекуле как минимум один флуорофор (органический

краситель или квантовую точку), а также тушители/акцепторы светового излучения. Строение зондов может быть различным: применяются зонды простые (меченые одним флуорофором), шпильчатого типа (молекулярные биконы), расщепляющиеся под действием эндонуклеаз или каталитически активных ПАКК (дезоксирибозимов), составные и др. Также удобный прием – добавление в реакционные смеси флуоресцентных нуклеозидтрифосфатов, обеспечивающих синтез флуоресцентно-меченых продуктов амплификации [58–61], однако следует учитывать возможное снижение в отдельных случаях эффективности реакции или полное ее ингибирование при применении подобных субстратов [61, 62]. Интересной с точки зрения используемой репортерной системы представляется работа Chen et al. [63], которые предложили особые “инвертированные” С-пробы с поли-dA-мотивами, приводящими к образованию ПАКК с множественными повторами dT₄₀. Последние образуют прочный комплекс с наночастицами меди, характеризующийся высоким квантовым выходом флуоресценции с максимумом при 580–600 нм и большим стоксовым сдвигом ($\Delta\lambda \sim 150$ нм). В технологиях, предусматривающих измерение люминесцентного сигнала, ПАКК образуют дезоксирибозимы или G-квадруплексы, которые в присутствии соответствующих кофакторов (катионов металлов, гема, dNTP и др.) приобретают активность пероксидаз и катализируют окисление флуорогенных субстратов, например, люминола, сопровождающееся выделением светового излучения [52–57].

Детекция результатов АКК по изменению окраски раствора часто не требует использования дорогостоящего оборудования, поскольку может осуществляться визуально. Наибольшее применение в колориметрических методах нашло окисление хромогенных субстратов: 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоной) кислоты (ABTS), 3,3'-диаминобензидина (ДАБ), 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ), *o*-фенилендиамин (ОФД) – до окрашенных продуктов (табл. 1). Разработаны колориметрические гибридационные зонды на основе наночастиц металлов, в первую очередь золота (НЧЗ) (табл. 1). Тандемный характер ПАКК обуславливает сближение металлических наночастиц при отжиге на нем подобных зондов; в случае зондов на основе НЧЗ происходит изменение окраски раствора от красной (пурпурной), характерной для разобщенных в пространстве НЧЗ, до синеватой, характерной для агрегатов НЧЗ. Проблема устойчивости зондов на основе НЧЗ в условиях проведения амплификационного анализа достаточно важна; ранее нами был предложен способ повышения их стабильности [71]. Помимо возможности использования НЧЗ в создании колориметрических зондов, к преимуществам можно отнести возможность их

применения для доставки олигонуклеотидов в клетки [72], например, АКК-праймеров.

Большинство способов электрохимической детекции базируется на применении либо гибридационных зондов, несущих электроактивную (метиленовый синий, ферроцен и др.) или проводящую (наночастицы металлов) метку, либо электроактивных частиц (гем, наночастицы металлов, метиленовый синий и др.), нековалентно связывающихся с нуклеиновыми кислотами. Электрохимические подходы стали основой для разработки разнообразных портативных биосенсорных устройств, которые используют в основном в медицинской диагностике [6].

В последние годы в АКК-анализе начали находить применение нетрадиционные для биохимических исследований виды аналитического сигнала. Так, новым направлением стало использование методологий магнитооптики [44, 73] и акустики [74]. Согласно работе Garbarino et al. [73], исследуемую НК-мишень закрепляют на поверхности магнитных микрочастиц путем их захвата специальными ДНК-пробами, проводят АКК и далее по изменению оптических свойств раствора в магнитном поле судят о характере протекания ферментативной реакции. Yang et al. [74] разработали акустический анализатор, в котором исследуемую бактериальную ДНК фиксировали с помощью захватывающих ДНК-проб на магнитных микрочастицах и далее инициировали АКК. Поскольку молекулы ДНК поглощают звуковое излучение в терагерцевом диапазоне хуже, чем молекулы воды, продукты АКК обуславливают значительное поглощение терагерцевого излучения после успешного протекания реакции, что может быть зафиксировано с помощью акустической спектроскопии.

ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ АМПЛИФИКАЦИИ “КАТЯЩИМСЯ КОЛЬЦОМ”

АКК первоначально применялась в основном для обнаружения специфических нуклеотидных последовательностей, однако по мере развития и появления новых молекулярных инструментов она трансформировалась в удобный метод исследования более сложных биообъектов, в том числе *in vivo*, и стала обеспечивать высокочувствительное определение аналитов разных типов.

Анализ нуклеиновых кислот. Первое применение АКК нашла в генотипировании, в частности при изучении однонуклеотидного полиморфизма – SNP [75, 76]. Для этой цели конструируются аллель-специфичные С-пробы, циклизация которых посредством дискриминирующего лигирования возможна только при полной комплементарности 3'-концевого нуклеотида С-пробы матрице

(рис. 3е). Позднее SNP-типирование с помощью АКК было переведено в производительные чиповый [77] и мультиплексный [78] форматы, и были предложены подходы, совмещающие аллель-специфичное лигирование и АКК с новыми способами генерации аналитического сигнала [50].

Наибольшее число ранних работ по АКК было посвящено обнаружению ДНК различных организмов [4, 5, 7]. Совершенствование методологии АКК обусловило появление новых оригинальных способов анализа ДНК. Например, в работах [67, 79] описаны колориметрические методы определения генетического материала растительного патогена *Phytophthora infestans* [67] и бактерии *Staphylococcus aureus* [79]. Первый из них основан на использовании АКК, запускаемой системой CRISPR/Cas9, и функционализированных НЧЗ в качестве гибридационных зондов. Особенность второго – многоуровневая система распознавания мишени и генерации аналитического сигнала, включающая использование биотин-меченых праймеров, дигоксин-меченых зондов, конъюгата НЧЗ с антидигоксигенином и пероксидазой и окисление ТМБ пероксидазой в микропланшетах, функционализированных стрептавидином.

С развитием АКК больше внимания стало уделяться также выявлению генетического материала различных вирусов, содержащих одноцепочечные ДНК или РНК, удобных в качестве поддерживающей матрицы при циклизации специфических С-проб. В настоящее время АКК-опосредованное обнаружение вирусов реализуют как в растворе (пробирках), так и в микрофлюидных устройствах [80], в формате электрохимических биосенсоров [81], совмещают с другими ферментативными реакциями, например, с ПЦР с обратной транскрипцией и последующей SDA [82].

В последние годы акцент в применении АКК смещается в сторону анализа короткоцепочечных нуклеиновых кислот, в первую очередь малых и не кодирующих РНК. В работе Ning et al. [83] описан способ обнаружения малых РНК с известной длиной и последовательностью с помощью ТКК в присутствии обратной транскриптазы SuperScript IV, РНК-полимеразы *E. coli* и нуклеазы Nb.BbvCI. Ciftci et al. предложили метод детекции гипервариантных РНК-вирусов, основанный на использовании С-проб с вырожденными 3'-концевыми нуклеотидами [84]. Для однозначной дифференцировки изоформных РНК предложены особые варианты С-пробы – iLock-пробы [85].

Большая часть работ, посвященных применению АКК в анализе рибонуклеиновых кислот, затрагивает количественную оценку микроРНК, выступающих важным маркером при диагностике различных патологических состояний [86]. Достижения в этой области представлены в недавних об-

зорах [87–89]. Первая работа по обнаружению микроРНК с помощью АКК была опубликована в 2006 г. [90]. Иной подход, получивший название miR-ID и заключающийся в циклизации микроРНК путем нематричного лигирования и последующей ТКК с обратной транскриптазой, был предложен в 2011 г. [26]. Оригинальный способ анализа микроРНК описан в работе Zhao et al. [51], согласно которому АКК инициируется специальной ДНК-триплексной структурой с мотивом ТА·Т. В большинстве случаев микроРНК выступает в качестве поддерживающей матрицы при циклизации С-пробы, нередко она используется одновременно и как затравочный праймер. В табл. 2 с целью иллюстрации многообразия существующих подходов приведено лишь несколько оригинальных технологий последних лет, в которых реализованы необычные способы генерации аналитического сигнала при АКК-анализе микроРНК. Большинство из предложенных технологий позволяют определять фемтомолярные концентрации микроРНК, кроме того, многие обеспечивают также анализ полиморфных вариантов микроРНК в пределах одного семейства [92].

Буквально в последние годы метод АКК начал применяться для анализа кольцевых РНК, играющих, как и микроРНК, важную роль в регуляции работы генов [93]. При обнаружении данного типа мишеней осуществляют ТКК напрямую с образцом РНК, выделенным из биоматериала, поскольку нет необходимости проводить циклизацию НК или вводить ее дополнительно. При проведении ТКК с обратной транскриптазой синтезируются транскрипты, детекция которых возможна либо путем ОТ-ПЦР, либо с помощью гель-электрофореза [94].

При разработке новых методов АКК-анализа исследователи не обошли вниманием и CRISPR/Cas-системы редактирования генома. Первыми систему CRISPR/Cas9 для обнаружения микроРНК использовали Qiu et al. [95]. Позднее были предложены варианты экспоненциальной АКК, в которых микроРНК выступает праймером для ТКК, приводящей к получению однонитевой РНК с повторами, расщепляемыми нуклеазой Cas12a, в результате чего генерируются новые праймерные последовательности [96]. CRISPR/Cas-система была применена не только для обнаружения специфических НК-мишеней, но также и для оценки образования неспецифических продуктов АКК за счет использования в качестве внутреннего отрицательного контроля в диагностических тест-системах [97].

Значительным достижением стала возможность проводить с помощью АКК анализ нуклеиновых кислот *in vivo*, что особенно актуально для молекул РНК [98, 99]. В работе Duckworth et al. [100] предложен метод мультиплексного профилирования РНК и оценки экспрессии поверх-

Таблица 2. Примеры работ по анализу микроРНК, описывающих оригинальные способы получения аналитического сигнала

Ссылка	Роль микроРНК	Принцип технологии	Предел обнаружения, М
[48]	Праймер	МикроРНК праймирует АКК на гантелеобразной С-пробе; продукт линейной АКК образует G-квадруплексы, в которые интеркалирует тиофлавин Т, обеспечивая появление флуоресцентного сигнала	4.9×10^{-15}
[49]	Запуск расщепления ДНК-дуплексов и генерация праймеров	Молекулы микроРНК отжигаются на продукте АКК, получаемом с КМ № 1, и образующиеся двухцепочечные структуры расщепляются дуплекс-специфической нуклеазой до фрагментов, которые далее праймируют АКК с КМ № 2. Новый продукт АКК образует G-квадруплексы, связывание которых с комплексом протопорфирина IX и ионов Zn^{2+} вызывает появление флуоресцентного сигнала	1×10^{-15}
[53]	Поддерживающая матрица и праймер	МикроРНК обеспечивает замыкание С-пробы и праймирует АКК, продукт которой расщепляется рестриктазой до фрагментов, дающих отдельные G-квадруплексы, связывающиеся с гемом. Образующиеся комплексы катализируют окисление <i>o</i> -фенилендиамина до окрашенного продукта, вызывающего тушение флуоресценции квантовых точек на основе MoS_2	4.6×10^{-15}
[54]	Поддерживающая матрица	В присутствии микроРНК С-проба замыкается в кольцо, обеспечивающее в ходе АКК образование ФВС – тримера G3, приобретающего после связывания с гемом свойства пероксидазы. Аналитический сигнал (изменение окраски) обеспечивается за счет окисления АВТС, катализируемого указанным миметиком пероксидазы	3.7×10^{-14}
[59]	Поддерживающая матрица и праймер	МикроРНК обеспечивает замыкание С-пробы и праймирует АКК в присутствии модифицированного нафталимидом трифосфата dUTP, что обеспечивает наработку флуоресцирующего продукта амплификации	3.58×10^{-15}
[68]	Запуск каскада ферментативных реакций	МикроРНК из экзосом связываются со специальной LNA-пробой, иммобилизованной на магнитных микрочастицах, вытесняя из комплекса с ним олигонуклеотиды, которые далее гибридизуются с закрепленными на золотом электроде зондами и праймируют на его поверхности АКК. Продукт АКК образует G-квадруплексы, связывающие электроактивный краситель метиленовый синий, который обеспечивает появление электрохимического сигнала	2.75×10^{-15}
[91]	Праймер	МикроРНК захватывается КМ, удерживающейся частично комплементарным ей зондом на поверхности модифицированных стрептавидином магнитных микрочастиц. МикроРНК праймирует АКК, продукт амплификации детектируется с помощью интеркалирующего красителя SGI	1×10^{-13}
[92]	Поддерживающая матрица	МикроРНК с помощью захватывающей ДНК-пробы фиксируется на поверхности микрофлюидных каналов и опосредует последующее матричное лигирование адаптора, выступающего праймером для АКК. Расщепление продукта АКК нуклеазой приводит к образованию новых молекул, инициирующих амплификацию. Детекцию результатов проводят с помощью интеркалирующего красителя SGI	$<1 \times 10^{-20}$

ностных белков для единичной клетки, что обусловило возможность изучения фенотипической и функциональной гетерогенности клеточных популяций. Описанный в данной работе подход включает этап комплексообразования с ионами лантаноидов (для детекции с помощью масс-цитометрии) или флуорофорами (для детекции с помощью проточной цитометрии). Zhang et al. первыми осуществили прижизненное обнаружение микроРНК [101], разработав биоразлагаемые металлоорганические наночастицы для доставки ДНК-полимеразы phi29 и специфической КМ в живые клетки и проведения в них АКК.

Анализ белков и малых молекул. Белки – второй по популярности тип биомолекул после НК, детектируемый с помощью АКК-подходов, при этом последние нередко включают методики иммуноферментного анализа (ИФА). Сама АКК в случае белков выступает инструментом, опосредующим их распознавание и/или генерацию аналитического сигнала. Как правило, АКК предваряется распознаванием белковой мишени рецептором, конъюгированным с праймером или ДНК-пробой, нередко этот процесс сочетают с селективным извлечением мишени из образца и/или фиксацией его на твердом носителе. Первой технологией обнаружения белков с помощью АКК стал подход, названный авторами “иммуно-АКК” (immuno-RCA) [102]. Согласно данному подходу, предварительно получают конъюгат олигонуклеотидного праймера, запускающего АКК на специальной КМ, с антителом. По завершении АКК продукт амплификации остается связанным с антителом, и его обнаружение становится возможным с помощью ИФА, например, после закрепления в лунках стандартного планшета (как показано на рис. 5в, 5г). Аналогично нуклеиновым кислотам, в последние годы появилось множество оригинальных методических работ, посвященных обнаружению и высокочувствительному определению белков с помощью АКК (табл. 3).

В случае белков анализ *in vivo* ограничивается пока выявлением мембранных протеинов. Например, в работе Liu et al. [110] описан способ визуализации MUC1 с помощью комплекса из трех олигонуклеотидов, один из которых образовывал аптамер к белку и отвечал за локализацию указанного комплекса на поверхности клеток, второй инициировал АКК, а третий был мечен флуорофором Cy5 и обеспечивал появление аналитического сигнала.

АКК находит применение также для анализа относительно небольших органических молекул: нуклеозидтрифосфатов, лекарственных и наркотических веществ, токсинов, ядохимикатов. Так, Qiu et al. предложили способ определения dNTP в клеточных экстрактах с пределом обнаружения в

несколько пМ [111]. В работе Lin et al. [112] описан метод количественной оценки гепарина в плазме крови с пределом обнаружения 0.83 нМ, основанный на вытеснении гепарином из комплекса с протамином праймеров, запускающих АКК. Разработаны аптамер-опосредованные способы обнаружения токсинов в различных объектах (например, охратоксина А в пиве [113] и в моче [114]), фармакологических препаратов [115], фосфорорганических пестицидов [116].

Детекция экзосом и отдельных клеток. Под детекцией экзосом и отдельных клеток подразумевается селективный анализ их конкретных типов или популяций с помощью АКК-подходов. В его основе лежит распознавание поверхностных биомолекул, преимущественно белковых рецепторов, специфических для исследуемого объекта, сопровождающееся генерацией аналитического сигнала. Распознавание проводят с помощью аптамерных ФВС; тандемная природа их расположения в цепи ПАКК может обеспечить как фиксацию одной молекулы ПАКК в нескольких точках поверхности одной и той же клетки или везикулы, так и взаимодействие одной молекулы ПАКК с несколькими клетками или везикулами (рис. 6). Данная особенность обуславливает возможность образования трехмерного каркаса из цепей НК, способного захватывать и удерживать исследуемый объект. Формирование трехмерной структуры часто сопровождается конгломерацией, приводящей к желированию реакционной массы или выпадению осадка [117].

Выделение и последующий анализ экзосом стали представлять интерес в силу их вовлеченности в процессы межклеточной коммуникации. Экзосомы имеют значительный потенциал в качестве биомаркеров для диагностики различных патологических состояний, например, раковых заболеваний [118, 119]. Наиболее популярной мишенью для взаимодействия с аптамерами на поверхности экзосом выступает мембранный белок CD63, а для генерации аналитического сигнала используют различные репортерные системы, например, НЧЗ с закрепленными на них флуоресцентными зондами [120], электроактивные комплексы G-квадруплексов с гемом [121], окислительные пероксидазы хрена [66] и др. Для повышения специфичности анализа экзосом был предложен метод с использованием двух ДНК-проб, несущих на 5'-концах остаток холестерина и аптамер к CD63 соответственно [122].

Несмотря на свои внушительные размеры, клетки также стали объектом приложения АКК. Так, в работе Yao et al. [117] описан способ селективного отбора мезенхимных стволовых клеток костного мозга, циркулирующих в крови человека. Он заключается в наработке с помощью АКК

Таблица 3. Примеры работ по анализу белков, описывающих оригинальные способы получения аналитического сигнала

Ссылка	Мишень	Принцип технологии	Предел обнаружения
[60]	Алкиладенингликозилаза (ААГ) и урацил-ДНК-гликозилаза (УДГ)	Бифункциональная биотинилированная двухцепочечная ДНК-проба, содержащая на противоположных цепях гипоксантин и урацил, подвергается действию алкиладенингликозилазы и урацил-ДНК-гликозилазы соответственно и затем расщепляется с помощью APE1 с образованием двух праймеров, которые иницируют АКК. Проведение амплификации в присутствии меченых нуклеотидов Су3-dCTP (для определения ААГ) и Су5-dGTP (для определения УДГ) обеспечивает появление флуоресцентного сигнала. Имобилизация продуктов АКК на стрептавидиновых магнитных микрочастицах обеспечивает селективное выделение их из раствора, а последующее расщепление экзонуклеазой позволяет проводить количественную оценку соответствующих ферментов по уровню флуоресценции	6.1×10^{-9} ед./мл ААГ, 1.5×10^{-9} ед./мл УДГ
[64]	Антитела к вирусу гепатита С (НСV)	Две специальные ДНК-пробы конъюгируют с антигеном НСV. В присутствии антител к НСV пробы сближаются и запускают реакцию SDA, в результате которой нарабатывается праймер, иницирующий АКК. Продукт АКК образует G-квадруплексы с активностью пероксидазы, катализирующие окисление 3,3',5,5'-тетраметилбензидина до окрашенного продукта	1.0×10^{-12} М
[70]	Тромбин	Графеновый электрод модифицируют наночастицами золота, к которым затем прикрепляют специальные ДНК-пробы, запускающие АКК. В результате амплификации образуются аптамеры к тромбину, связывание которого на поверхности электрода изменяет его электрохимический потенциал	3.5×10^{-14} М
[103]	T4 ДНК-лигаза и полинуклеотидкиназа	Полинуклеотидкиназа и лигаза катализируют фосфорилирование и циклизацию С-пробы соответственно. Их содержание в образце оценивают по количеству продукта АКК, эффективность наработки которого коррелирует с содержанием данных ферментов в образце	3.4×10^{-4} ед./мл лигазы, 3.8×10^{-4} ед./мл полинуклеотидкиназы
[104]	NF-κB p50	Связывание белка со специфической шпилечной ДНК-пробой запускает каскад ферментативных превращений, включающий реакции SDA, АКК и нуклеазного расщепления и приводящий в случае прочного связывания к образованию G-квадруплексов, взаимодействие которых с тиофлавином Т обуславливает появление флуоресцентного сигнала	1.0×10^{-13} М

Таблица 3. Окончание

Ссылка	Мишень	Принцип технологии	Предел обнаружения
[105]	Факторы транскрипции	Связывание белков со специфической шпилечной ДНК-пробой предотвращает ее расщепление нуклеазой и, обеспечивая ее целостность, позволяет далее проводить замыкание пробы и последующую АКК, в результате которой образуются G-квадруплексы. Взаимодействие последних с N-метил-мезопорфирином IX обуславливает появление флуоресцентного сигнала	88×10^{-12} М
[106]	Простат-специфический антиген (ПСА)	ПСА опосредует связывание магнитных частиц с НЧЗ, несущими праймеры для АКК, продукт которой гибридизуется с зондами, конъюгированными с инвертазой. Указанный фермент превращает сахарозу в глюкозу, уровень которой измеряется с помощью персонального глюкометра	0.1 пг/мл
[107]	ДНК-метилтрансфераза I и урацил-ДНК-гликозилаза (УДГ)	Специфическая ДНК-проба, несущая сайт распознавания метилтрансферазы I и урацил, подвергается действию ДНК-метилтрансферазы I и урацил-ДНК-гликозилазы, а затем обработке эндонуклеазами BssHII и Endo IV. В результате расщепления высвобождается короткая одноцепочечная ДНК, инициирующая АКК, продукт которой образует G-квадруплексы; интеркаляция в них тиофлавина Т вызывает появление флуоресцентного сигнала	0.009 ед./мл метилтрансферазы, 0.003 ед./мл УДГ
[108]	Dam-метилтрансфераза	Специальная шпилечная ДНК-проба с сайтом метилтрансферазы метилируется под действием фермента; ее последующее расщепление с помощью DpnI приводит к образованию праймеров, запускающих АКК. Продукт АКК детектируют с помощью красителя SGI	1.8 ед./мл
[109]	Теломераза	В присутствии активной теломеразы происходит удлинение специального праймера на пять нуклеотидов (GGGTT), что оказывается достаточным для его участия далее в качестве поддерживающей матрицы при циклизации C-пробы и запуске АКК. Уровень наработки продукта АКК детектируют с помощью молекулярных биконов	—

двух типов ПАКК, один из которых формирует аптамеры к белку APLP, а второй содержит участки, комплементарные первой цепи. В результате инкубации смеси ПАКК и крови происходит образование трехмерной сети из цепей ДНК, в которой фиксируются стволовые клетки; образующийся конгломерат легко выпадает в осадок и далее отделяется. Захват клеток патогенного штамма *Escherichia coli* O157:H7 путем закупорки жидкостных микроканалов осуществили Jiang et al. [41]. Был предложен высокочувствительный

спектрофлуориметрический способ обнаружения циркулирующих опухолевых клеток, отработанный на модели карциномы молочной железы человека [123]. Другой, электрохимический метод детекции циркулирующих опухолевых клеток основан на захвате опухолевых клеток продуктом АКК, биотинилированным за счет встраивания в ходе синтеза биотин-меченых нуклеотидов dA, и фиксации на модифицированном стрептавидином электроде [124].

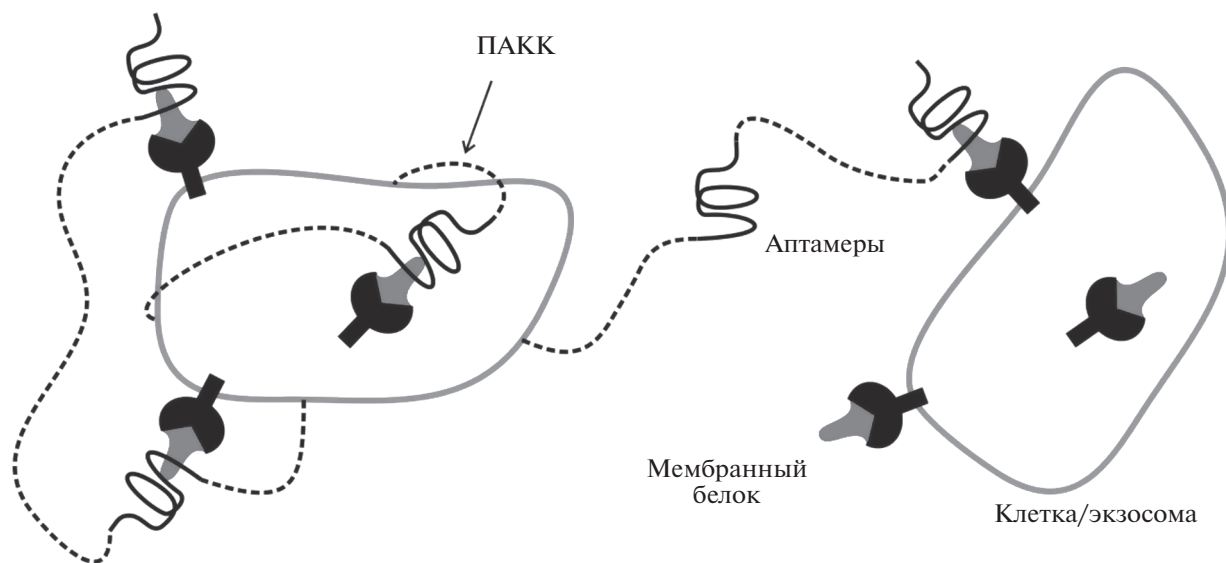


Рис. 6. Распознавание клеток или экзосом продуктом АКК путем взаимодействия аптамеров с рецепторами на их поверхности.

АКК-анализ применяется и для выявления различных патогенных микроорганизмов. Franch et al. разработали подход для определения микобактерий – возбудителей туберкулеза, в котором детектируется ферментативная активность кодируемого микобактериями фермента топоизомеразы IA [125]. На примере метициллин-устойчивого золотистого стафилококка предложена технология выявления микроорганизмов с устойчивостью к антибиотикам, основанная на образовании в ходе АКК специфических аптамеров и включающая усиление аналитического сигнала за счет совмещения с системой CRISPR-Cas12a [126]. Разработаны способы выявления грибных патогенов, например, встречающихся в Бразилии представителей рода *Fonsecaea* [127], и одноклеточных водорослей [128].

Прочие приложения АКК. Помимо анализа описанных выше биомешиней, АКК находит применение также для выявления аналитов небиологического происхождения. Так, предложены способы обнаружения ионов тяжелых металлов в объектах окружающей среды, основанные на расщеплении флуоресцентных зондов под действием дезоксирибозимов, находящихся в структуре ПАКК и активирующихся в присутствии данных катионов, или за счет комплексообразования с НК [129]. Кроме аналитических приложений, АКК используется для высокоэффективной амплификации крупных кольцевых матриц при создании библиотек для секвенирования [33], для генетического анализа бактериальных симбионтов путем наработки в ходе АКК продуктов амплификации их специфических плазмид [130]. Аналогично плазмидам, возможна

амплификация и последующее секвенирование митохондриального генома [131] и кольцевых вирусных геномов [132]. АКК – более удобная альтернатива ПЦР для наработки большого количества последовательностей-кандидатов при подборе аптамеров с помощью стратегии SELEX [133]. Возможность конструирования кольцевых матриц с заданной нуклеотидной последовательностью позволяет получать ПАКК, обеспечивающие образование самособирающихся ДНК-наноструктур, что представляет интерес для бионанотехнологии [4], в частности для таргетной доставки лекарственных средств, систем РНК-интерференции и геномного редактирования [134–136].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные в настоящем обзоре данные демонстрируют, что амплификация “катящимся кольцом” – универсальный инструмент, который, будучи включенным в состав нового аналитического метода или технологии, может обеспечить проведение анализа биомешиней различной химической природы: нуклеиновых кислот, белков, ферментов, антибиотиков, токсинов и др. АКК-опосредованные подходы применимы как для качественного обнаружения аналитов, так и для их количественного определения, причем они характеризуются высокой чувствительностью с пределами обнаружения вплоть до концентраций порядка 10^{-15} М. Высокие специфичность и чувствительность АКК-анализа позволяют детектировать аналиты в сложных смесях, т.е. без выделения в чистом виде.

Огромное число работ по АКК-опосредованному анализу, опубликованных в последнее время, свидетельствует о повышенном интересе и значительном практическом потенциале реакции АКК, однако доля работ по ее применению в количественном определении биоаналитов в реальных образцах недостаточно велика. Кроме того, в отличие от прочих методов изотермической амплификации [137–139], АКК не нашла до сих пор применения в молекулярной диагностике коронавируса SARS-CoV-2. По-видимому, требуется проведение дальнейших исследований по усовершенствованию и оптимизации соответствующих АКК-опосредованных методов, отработке их на клиническом материале, упрощении, если это возможно, отдельных технологий и методов, поиск или создание новых молекулярных инструментов, расширяющих потенциал АКК. Несомненно, при разработке диагностических тест-систем должны быть обеспечены требуемая точность и специфичность анализа, исключающие получение как ложноположительных, так и ложноотрицательных результатов.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-14-50120).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит описания исследований, выполненных кем-либо из авторов, с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Mullis K.B., Faloona F.A. // *Meth. Enzymol.* 1987. V. 155. P. 335–350. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)55023-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)55023-6)
- Fakrudin Md., Mannan K.S.B., Chowdhury A., Mazumdar R.M., Hossain Md.N., Islam S., Chowdhury Md.A. // *J. Pharm. Bioallied Sci.* 2013. V. 5. P. 245–252. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.120066>
- Бодулев О.Л., Сахаров И.Ю. // *Биохимия.* 2020. Т. 85. С. 174–196. <https://doi.org/10.31857/S0320972520020037>
- Ali M.M., Li F., Zhang Z., Zhang K., Kang D.-K., Ankrum J.A., Le X.C., Zhao W. // *Chem. Soc. Rev.* 2014. V. 43. P. 3324–3341. <https://doi.org/10.1039/c3cs60439j>
- Sarkar S., Sabhachandani P., Konry T. // *Trends Biotechnol.* 2017. V. 35. P. 186–189. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.09.006>
- Qi H., Yue S., Bi S., Ding C., Song W. // *Biosens. Bioelectron.* 2018. V. 110. P. 207–217. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.03.065>
- Gu L., Yan W., Liu L., Wang S., Zhang X., Lyu M. // *Pharmaceuticals.* 2018. V. 11. P. 35. <https://doi.org/10.3390/ph11020035>
- Fire A., Xu S.Q. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995. V. 92. P. 4641–4645. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.10.4641>
- Mohsen M.G., Kool E.T. // *Acc. Chem. Res.* 2016. V. 49. P. 2540–2550. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.6b00417>
- Banér J., Nilsson M., Isaksson A., Mendel-Hartvig M., Antson D.-O., Landegren U. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2001. V. 12. P. 11–15. [https://doi.org/10.1016/s0958-1669\(00\)00174-9](https://doi.org/10.1016/s0958-1669(00)00174-9)
- An R., Li Q., Fan Y., Li J., Pan X., Komiyama M., Liang X. // *Nucleic Acids Res.* 2017. V. 45. e139. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx553>
- Lohman G.J.S., Zhang Y., Zhelkovsky A.M., Cantor E.J., Evans T.C., Jr. // *Nucleic Acids Res.* 2014. V. 42. P. 1831–1844. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1032>
- Krzywkowski T., Nilsson M. // *Nucleic Acids Res.* 2017. V. 45. P. e161. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx708>
- Сахабутдинова А.Р., Максимова М.А., Гарафутдинов Р.Р. // *Мол. биология.* 2017. Т. 51. С. 724–733. <https://doi.org/10.7868/S0026898417040164>
- Sasaki N., Kase C., Chou M., Nakazato G., Sato K. // *Anal. Biochem.* 2020. V. 593. P. 113596. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113596>
- Dolinnaya N.G., Blumenfeld M., Merenkova I.N., Oretskaya T.S., Krynetskaya N.F., Ivanovskaya M.G., Vasseur M., Shabarova Z.A. // *Nucleic Acids Res.* 1993. Vol. 21. P. 5403–5407. <https://doi.org/10.1093/nar/21.23.5403>
- Xu Y., Kool E.T. // *Tetrahedron Lett.* 1997. V. 38. P. 5595–5598. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(97\)01266-5](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(97)01266-5)
- Herrlein M.K., Nelson J.S., Letsinger R.L. // *J. Am. Chem. Soc.* 1995. V. 117. P. 10151–10152. <https://doi.org/10.1021/ja00145a042>
- El-Sagheer A.H., Brown T. // *Acc. Chem. Res.* 2012. V. 45. P. 1258–1267. <https://doi.org/10.1021/ar200321n>
- Устинов А.В., Степанова И.А., Дубнякова В.В., Зацепин Т.С., Ножевникова Е.В., Коршун В.А. // *Биоорг. химия.* 2010. Т. 36. С. 437–481. [Ustinov A.V., Stepanova I.A., Dubnyakova V.V., Nozhevnikova E.V., Korshun V.A., Zatsepin T.S. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2010. V. 39. P. 401–445.] <https://doi.org/10.1134/S1068162010040011>
- Hagerman P.J. // *Biopolymers.* 1981. V. 20. P. 1503–1535. <https://doi.org/10.1002/bip.1981.360200710>
- Joffroy B., Uca Y.O., Prešern D., Doye J.P.K., Schmidt T.L. // *Nucleic Acids Res.* 2018. V. 46. P. 538–545. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1238>

23. Dean F.B., Nelson J.R., Giesler T.L., Lasken R.S. // *Genome Res.* 2001. V. 11. P. 1095–1099. <https://doi.org/10.1101/gr.180501>
24. Mao Y., Liu M., Tram K., Gu J., Salena B.J., Jiang Y., Li Y. // *Chemistry.* 2015. V. 21. P. 8069–8074. <https://doi.org/10.1002/chem.201500994>
25. Li Z., Lau C., Lu J. // *Anal. Chem.* 2016. V. 88. P. 6078–6083. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b01460>
26. Kumar, P. Johnston B.H., Kazakov S.A. // *RNA.* 2011. V. 17. P. 365–380. <https://doi.org/10.1261/rna.2490111>
27. Wang G., Ding X., Hu J., Wu W., Sun J., Mu Y. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. P. 13928. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13324-0>
28. Garafutdinov R.R., Gilvanov A.R., Sakhabutdinova A.R. // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2020. V. 190. P. 758–771. <https://doi.org/10.1007/s12010-019-03127-6>
29. Yang Q., Zhang Y., Li S., Lu X., Yuan Y., Zhang W. // *J. Dairy. Sci.* 2019. V. 102. P. 9702–9710. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16724>
30. Garafutdinov R.R., Sakhabutdinova A.R., Kupryushkin M.S., Pyshtnyi D.V. // *Biochimie.* 2020. V. 168. P. 259–267. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.11.013>
31. Сахабутдинова А.Р., Мирсаева Л.Р., Оскорбин И.П., Филипенко М.Л., Гарафутдинов Р.Р. // *Биоорг. химия.* 2020. Т. 46. С. 56–64. [Sakhabutdinova A.R., Mirsaeva L.R., Garafutdinov R.R., Oskorbin I.P., Filipenko M.L. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2020. V. 39. P. 245–251.] <https://doi.org/10.1134/S1068162020010082>
32. Garafutdinov R.R., Gilvanov A.R., Kurova O.Y., Sakhabutdinova A.R. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2020. V. 161. P. 1447–1455. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.028>
33. Maïno N., Hauling T., Cappi G., Madaboosi N., Dupouy D.G., Nilsson M. // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. P. 3542. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40026-6>
34. Zhang D.Y., Brandwein M., Hsuih T., Li H.B. // *Mol. Diagn.* 2001. V. 6. P. 141–150. <https://doi.org/10.1054/modi.2001.25323>
35. Dahl F., Banér J., Gullberg M., Mendel-Hartvig M., Landerger U., Nilsson M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. V. 101. P. 4548–4553. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400834101>
36. Tian B., Gao F., Fock J., Dufva M., Hansen M.F. // *Biosens. Bioelectron.* 2020. V. 165. P. 112356. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112356>
37. Murakami T., Sumaoka J., Komiyama M. // *Nucleic Acids Res.* 2009. V. 37. P. e19. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn1014>
38. Li D., Zhang T., Yang F., Yang F., Yuan R., Xiang Y. // *Anal. Chem.* 2020. V. 92. P. 2074–2079. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b04585>
39. Nallur G., Luo C., Fang L., Cooley S., Varshal D., Lambert J., Kukanskis K., Kingsmore S., Lasken R., Schweitzer B. // *Nucleic Acids Res.* 2001. V. 29. P. e118. <https://doi.org/10.1093/nar/29.23.e118>
40. Xu X., Zhang B., Gan P., Wu J., Dai W., Zhang L., Wang J. // *Anal. Biochem.* 2017. V. 533. P. 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.06.005>
41. Jiang Y., Qiu Z., Le T., Zou S., Cao X. // *Anal. Chim. Acta.* 2020. V. 1127. P. 79–88. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.06.046>
42. Shi D., Huang J., Chuai Z., Chen D., Zhu X., Wang H., Peng J., Wu H., Huang Q., Fu W. // *Biosens. Bioelectron.* 2014. V. 62. P. 280–287. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.06.066>
43. Wang F., Lu C.-H., Liu X., Freage L., Willner I. // *Anal. Chem.* 2014. V. 86. P. 1614–1621. <https://doi.org/10.1021/ac4033033>
44. Minero G.A.S., Cangiano V., Fock J., Garbarino F., Hansen M.F. // *Methods Mol. Biol.* 2020. V. 2063. P. 3–15. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0138-9_1
45. Chai H., Wang M., Zhang C., Tang Y., Miao P. // *Bioconjug. Chem.* 2020. V. 31. P. 764–769. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.9b00861>
46. Wang S., Ji Y., Fu H., Ju H., Lei J. // *Analyst.* 2019. V. 144. P. 691–697. <https://doi.org/10.1039/c8an01892h>
47. Zhou H., Duan S., Huang J., He F. // *Chem. Commun.* 2020. V. 56. P. 6273–6276. <https://doi.org/10.1039/D0CC01619E>
48. Liu L.-Q., Yin F., Lu Y., Yan X.-L., Wu C.-C., Li X., Li C. // *Nanomedicine.* 2020. V. 32. P. 102339. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2020.102339>
49. Kim M., Kim D.-M., Kim D.-E. // *Analyst.* 2020. V. 145. P. 6130–6137. <https://doi.org/10.1039/d0an01329c>
50. Гарафутдинов Р.Р., Никоноров Ю.М., Чемерис Д.А., Постригань Б.Н., Чубукова О.В., Талипов Р.Ф., Вахитов В.А., Чемерис А.В. // *Биоорг. химия.* 2009. Т. 35. С. 665–673. [Garafutdinov R.R., Nikonorov Y.M., Chemeris D.A., Postriгань B.N., Chubukova O.V., Vakhitov V.A., Chemeris A.V., Talipov R.F. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2009. V. 35. P. 599–606.] <https://doi.org/10.1134/S1068162009050100>
51. Zhao Y., Wang Y., Liu S., Wang C., Liang J., Li S., Qu X., Zhang R., Yu J., Huang J. // *Analyst.* 2019. V. 144. P. 5245–5253. <https://doi.org/10.1039/c9an00953a>
52. Ge J., Hu Y., Deng R., Li Z., Zhang K., Shi M., Yang D., Cai R., Tan W. // *Anal. Chem.* 2020. V. 92. P. 13588–13594. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c03405>
53. Qu X., Bian F., Guo Q., Ge Q., Sun Q., Huang X. // *Anal. Chem.* 2018. V. 90. P. 12051–12058. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b02820>
54. Wang J., Mao S., Li H.-F., Lin J.-M. // *Anal. Chim. Acta.* 2018. V. 1027. P. 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.04.028>
55. Xu J., Guo J., Maina S.W., Yang Y., Hu Y., Li X., Qiu J., Xin Zh. // *Anal. Biochem.* 2018. V. 549. P. 136–142. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2018.03.013>
56. Mi L., Sun Y., Shi L., Li T. // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2020. V. 12. P. 7879–7887. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b18053>

57. Wang J., Haghghatbin M.A., Shen W., Mi L., Cui H. // *Anal. Chem.* 2020. V. 92. P. 7062–7070. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c00377>
58. Smolina I.V., Cherny D.I., Nietupski R.M., Beals T., Smith J.H., Lane D.J., Broude N.E., Demidov V.V. // *Anal. Biochem.* 2005. V. 347. P. 152–155. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2005.06.002>
59. Kumara G.S.R., Pandith A., Seo Y.J. // *Analyst.* 2020. V. 145. P. 4777–4781. <https://doi.org/10.1039/d0an00723d>
60. Li C.-C., Chen H.-Y., Hu J., Zhang C.-Y. // *Chem. Sci.* 2020. V. 11. P. 5724–5734. <https://doi.org/10.1039/d0sc01652g>
61. Goryunova M.S., Arzhanik V.K., Zavriev S.K., Ryazantsev D.Y. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2021. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03322-7>
62. Tasara T., Angerer B., Damond M., Winter H., Dörhöfer S., Hübscher U., Amacker M. // *Nucleic Acids Res.* 2003. V. 31. P. 2636–2646. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg371>
63. Chen C.-A., Wang C.-C., Kou H.-S., Wu S.-M. // *Anal. Chim. Acta.* 2020. V. 1123. P. 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.04.026>
64. Li R., Liu Q., Jin Y., Li B. // *Microchim. Acta.* 2020. V. 187. P. 139. <https://doi.org/10.1007/s00604-019-4093-2>
65. Gao T., Chai W., Shi L., Shi H., Sheng A., Yang J., Li G. // *Analyst.* 2019. V. 144. P. 6365–6370. <https://doi.org/10.1039/c9an01466g>
66. Zeng R., Wang J., Wang Q., Tang D., Lin Y. // *Talanta.* 2021. V. 221. P. 121600. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121600>
67. Chang W., Liu W., Liu Y., Zhan F., Chen H., Lei H., Liu Y. // *Microchim. Acta.* 2019. V. 186. P. 243. <https://doi.org/10.1007/s00604-019-3348-2>
68. Tang X., Wang Y., Zhou L., Zhang W., Yang S., Yu L., Yu L., Zhao S., Chang K., Chen M. // *Microchim. Acta.* 2020. V. 187. P. 6130–6137. <https://doi.org/10.1007/s00604-020-4143-9>
69. Gao F., Zhou F., Chen S., Yao Y., Wu J., Yin D., Geng D., Wang P. // *Analyst.* 2017. V. 142. P. 4308–4316. <https://doi.org/10.1039/c7an01434a>
70. Wu Z.-W., Xie X.-C., Guo H.-R., Xia H., Huang K.-J. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2020. V. 412. P. 915–922. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-02314-y>
71. Гарафутдинов Р.Р., Сахабутдинова А.Р., Чемерис А.В. // *Биоорг. химия.* 2015. Т. 41. С. 327–335. [Garfutdinov R.R., Sakhabutdinova A.R., Chemeris A.V. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2015. V. 41. P. 289–296.] <https://doi.org/10.1134/S1068162015030036>
72. Шашкова В.В., Епанчинцева А.В., Воробьев П.Е., Разум К.В., Рябчикова Е.И., Пышный Д.В., Пышная И.А. // *Биоорг. химия.* 2017. Т. 43. С. 75–82. [Shashkova V.V., Epanchintseva A.V., Vorobjev P.E., Razum K.V., Ryabchikova E.I., Pyshnyi D.V., Pyshnaya I.A. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2017. V. 43. P. 64–70.] <https://doi.org/10.1134/S106816201606011X>
73. Garbarino F., Minero G.A.S., Rizzi G., Fock J., Hansen M.F. // *Biosens Bioelectron.* 2019. V. 142. P. 111485. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111485>
74. Yang X., Yang K., Zhao X., Lin Zh., Liu Zh., Luo Sh., Zhang Y., Wang Y., Fu W. // *Analyst.* 2017. V. 142. P. 4661–4669. <https://doi.org/10.1039/c7an01438d>
75. Lizardi P.M., Huang X., Zhu Z., Bray-Ward P., Thomas D.C., Ward D.C. // *Nat. Genet.* 1998. V. 19. P. 225–232. <https://doi.org/10.1038/898>
76. Christian A.T., Pattee M.S., Attix C.M., Reed B.E., Sorensen K.J., Tucker J.D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. V. 98. P. 14238–14243. <https://doi.org/10.1073/pnas.251383598>
77. Hatch A., Sano T., Misasi J., Smith C.L. // *Genet. Anal.* 1999. V. 15. P. 35–40. [https://doi.org/10.1016/s1050-3862\(98\)00014-x](https://doi.org/10.1016/s1050-3862(98)00014-x)
78. Faruqi A.F., Hosono S., Driscoll M.D., Dean F.B., Alsmadi O., Bandaru R., Kumar G., Grimwade B., Zong Q., Sun Z., Du Y., Kingsmore S., Knott T., Lasken R.S. // *BMC Genomics.* 2001. V. 2. P. 4. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-2-4>
79. Li Y., Wang J., Wang S., Wang J. // *Microchim. Acta.* 2020. V. 187. P. 119. <https://doi.org/10.1007/s00604-019-4082-5>
80. Soares R.R.G., Varela J.C., Neogi U., Ciftci S., Ashokkumar M., Pinto I.F., Nilsson M., Madaboosi N., Russon A. // *Biosens. Bioelectron.* 2020. V. 166. P. 112442. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112442>
81. Ciftci S., Cánovas R., Neumann F., Pailraj T., Nilsson M., Crespo G.A., Madaboosi N. // *Biosens. Bioelectron.* 2020. V. 151. P. 112002. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.112002>
82. Lee H., Kim D.-M., Kim D.-E. // *Analyst.* 2021. V. 145. P. 8002–8007. <https://doi.org/10.1039/d0an01326a>
83. Ning L., Wang X., Xu K., Song S., Li Q., Yang X. // *Biochimie.* 2019. V. 163. P. 137–141. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.06.003>
84. Ciftci S., Neumann F., Hernández-Neuta I., Hakhverdyan M., Bálint Á., Herthnek D., Madaboosi N., Nilsson M. // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. P. 2872. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39854-3>
85. Krzywkowski T., Kühnemund M., Nilsson M. // *RNA.* 2019. V. 25. P. 82–89. <https://doi.org/10.1261/rna.066753.118>
86. Saliminejad K., Khorshid H.R.K., Fard S.S., Ghaffari S.H. // *J. Cell. Physiol.* 2019. V. 234. P. 5451–5465. <https://doi.org/10.1002/jcp.27486>
87. Cheng Y., Dong L., Zhang J., Zhao Y., Li Z. // *Analyst.* 2018. V. 143. P. 1758–1774. <https://doi.org/10.1039/c7AN02001E>
88. Ye J., Xu M., Tian X., Cai S., Zeng S. // *J. Pharm. Anal.* 2019. V. 9. P. 217–226. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2019.05.004>
89. Gines G., Menezes R., Xiao W., Rondelez Y., Taly V. // *Mol. Aspects. Med.* 2020. V. 72. P. 100832. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2019.11.002>

90. *Jonstrup S.P., Koch J., Kjems J.* // *RNA*. 2006. V. 12. P. 1747–1752.
<https://doi.org/10.1261/rna.110706>
91. *Lu W., Wang Y., Song S., Chen C., Yao B., Wang M.* // *Analyst*. 2018. V. 143. P. 5046–5053.
<https://doi.org/10.1039/c8an01544a>
92. *Cao H., Zhou X., Zeng Y.* // *Sens. Actuators B Chem.* 2019. V. 279. P. 447–457.
<https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.09.121>
93. *Li J., Mohammed-Elsabagh M., Paczkowski F., Li Y.* // *Chembiochem*. 2020. V. 21. P. 1547–1566.
<https://doi.org/10.1002/cbic.202000003>
94. *Boss M., Arenz C.* // *ChemBioChem*. 2020. V. 21. P. 793–796.
<https://doi.org/10.1002/cbic.201900514>
95. *Qiu X.-Y., Zhu L.-Y., Zhu C.-S., Ma J.-X., Hou T., Wu X.-M., Xie S.-S., Min L., Tan D.-A., Zhang D.-Y., Zhu L.* // *ACS Synth Biol*. 2018. V. 7. P. 807–713.
<https://doi.org/10.1021/acssynbio.7b00446>
96. *Tian W., Liu X., Wang G., Liu C.* // *Chem. Commun.* 2020. V. 56. P. 13445–13448.
<https://doi.org/10.1039/d0cc06034h>
97. *Tian B., Minero G.A.S., Fock J., Dufva M., Hansen M.F.* // *Nucleic Acids Res.* 2020. V. 48. P. e30.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkaa017>
98. *Takahashi H., Horio K., Kato S., Kobori T., Watanabe K., Aki T., Nakashimada Y., Okamura Y.* // *Sci. Rep.* 2020. V. 10. P. 9588.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-65864-7>
99. *Lin C., Jiang M., Duan S., Qiu J., Hong Y., Wang X., Chen X., Ke R.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2020. V. 526. P. 607–611.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.03.134>
100. *Duckworth A.D., Gherardini P.F., Sykorova M., Yasin F., Nolan G.P., Slupsky J.R., Kalakonda N.* // *Nat. Protoc.* 2019. V. 14. P. 901–920.
<https://doi.org/10.1038/s41596-018-0120-8>
101. *Zhang J., He M., Nie C., He M., Pan Q., Liu C., Hu Y., Yi J., Chen T., Xia C.* // *Anal. Chem.* 2019. V. 91. P. 9049–9057.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b01343>
102. *Schweitzer B., Wiltshire S., Lambert J., O'Malley S., Kukanskis K., Zhu Z., Kingsmore S.F., Lizardi P.M., Ward D.C.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000. V. 97. P. 10113–10119.
<https://doi.org/10.1073/pnas.170237197>
103. *Jiang H., Xu Y., Dai L., Liu X., Kong D.* // *Sens. Actuators B Chem.* 2018. V. 260. P. 70–77.
<https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.12.203>
104. *Xu X., Wang L., Zhu D., Wang Y., Jiang W.* // *Talanta*. 2018. V. 186. P. 293–298.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.04.047>
105. *Zhang K., Wang L., Zhao H., Jiang W.* // *Talanta*. 2018. V. 179. P. 331–336.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.11.028>
106. *Sun F., Sun X., Jia Y., Hu Z., Xu S., Li L., Na N., Ouyang J.* // *Analyst*. 2019. V. 144. P. 6019–6024.
<https://doi.org/10.1039/c9an01558b>
107. *Fan L., Peng Y., Ning B., Wei H., Gao Z., Bai J., Guo L.* // *Anal. Chim. Acta*. 2020. V. 1103. P. 164–173.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.12.058>
108. *Chen L., Zhang Y., Xia Q., Luo F., Guo L., Qiu B., Lin Z.* // *Anal. Chim. Acta*. 2020. V. 1122. P. 1–8.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.04.061>
109. *Liu Y., Li S., Zhang L., Zhao Q., Li N., Wu Y.* // *ACS Omega*. 2020. V. 5. P. 11836–11841.
<https://doi.org/10.1021/acsomega.0c01459>
110. *Liu X., Mao D., Deng G., Song Y., Zhang F., Yang S., Yang S., Li G., Liu F., Cao W., Zhu X.* // *Theranostics*. 2020. V. 10. P. 4410–4421.
<https://doi.org/10.7150/thno.42951>
111. *Qiu X., Guittet O., Mingoes C., El Banna N., Huang M.-E., Lepoivre M., Hildebrandt N.* // *Anal. Chem.* 2019. V. 91. P. 14561–14568.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b03624>
112. *Lin L., Li B., Han X., Zhang F., Zhang X., Linhardt R.J.* // *Analyst*. 2021. V. 146. P. 714–720.
<https://doi.org/10.1039/d0an02061c>
113. *Hao L., Wang W., Shen X., Wang S., Li Q., An F., Wu S.* // *J. Agric. Food. Chem.* 2020. V. 68. P. 369–375.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b06021>
114. *Santovito S., Greco D., D'Ascanio V., Sanzani S.M., Avantaggiato G.* // *Anal. Chim. Acta*. 2020. V. 1133. P. 20–29.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.07.078>
115. *Huang Y., Wang C., Huo Q., Song Y., Du G., Wang L., Yang X., Chen X.* // *Anal. Bioanal. Chem.* 2020. V. 412. P. 4555–4563.
<https://doi.org/10.1007/s00216-020-02708-3>
116. *Tang J., Li J., Xiong P., Sun Y., Zeng Z., Tian X., Tang D.* // *Microchim. Acta*. 2020. V. 187. P. 450.
<https://doi.org/10.1007/s00604-020-04434-0>
117. *Yao C., Tang H., Wu W., Tang J., Guo W., Luo D., Yang D.* // *J. Am. Chem. Soc.* 2020. V. 142. P. 3422–3429.
<https://doi.org/10.1021/jacs.9b11001>
118. *Шушкова Н.А., Новикова С.Е., Згода В.Г.* // *Биомед. хим.* 2019. Т. 65. С. 457–467.
<https://doi.org/10.18097/PBMC20196506457>
119. *Yu W., Hurley J., Roberts D., Chakraborty S., Enderle D., Noerholm M., Breakefield X.O., Skog J.* // *Ann. Oncol.* 2021. V. 32. P. 466–477.
<https://doi.org/10.1016/j.annonc.2021.01.074>
120. *Gao M.-L., Yin B.-C., Ye B.-C.* // *Analyst*. 2019. V. 144. P. 5996–6003.
<https://doi.org/10.1039/c9an01328h>
121. *Huang R., He L., Xia Y., Xu H., Liu C., Xie H., Wang S., Peng L., Liu Y., Liu Y., He N., Li Z.* // *Small*. 2019. V. 15. P. e1900735.
<https://doi.org/10.1002/smll.201900735>
122. *Zhao X., Luo C., Mei Q., Zhang H., Zhang W., Su D., Fu W., Luo Y.* // *Anal. Chem.* 2020. V. 92. P. 5411–5418.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c00141>
123. *Sun S., Yang S., Hu X., Zheng C., Song H., Wang L., Shen Z., Wu Z.-S.* // *ACS Sens.* 2020. V. 5. P. 3870–3878.
<https://doi.org/10.1021/acssensors.0c01082>
124. *Gao Z., Wu C., Lv S., Wang C., Zhang N., Xiao S., Han Y., Xu H., Zhang Y., Li F., Lyu J., Shen Z.* // *Anal. Bioanal. Chem.* 2018. V. 410. P. 6819–6826.
<https://doi.org/10.1007/s00216-018-1277-2>

125. Franch O., Han X., Marcussen L.B., Givskov A., Andersen M.B., Godbole A.A., Harmsen C., Nørskov-Lauritsen N., Thomsen J., Pedersen E.S., Wang Y., Shi D., Wejse C., Pødenphant L., Nagaraja V., Bertl J., Stougaard M., Ho Y.-P., Hede M.S., Labouriau R., Knudsen B.R. // *Nanoscale*. 2019. V. 11. P. 587–597. <https://doi.org/10.1039/c8nr07850e>
126. Xu L., Dai Q., Shi Z., Liu X., Gao L., Wang Z., Zhu X., Li Z. // *J. Microbiol. Methods*. 2020. V. 173. P. 105917. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.105917>
127. Voidaleski M.F., Gomes R.R., de Azevedo C.M.P.S., de Souza Lima B.J.F., de Fátima Costa F., Bombassaro A., Fornari G., da Silva I.C.L., Andrade L.V., Lusosa B.P.R., Najafzadeh M.J., de Hoog G.S., Vicente V.A. // *J. Fungi*. 2020. V. 6. P. 29. <https://doi.org/10.3390/jof6040290>
128. Qin Y., Zhang C., Liu F., Chen Q., Yang Y., Wang Y., Chen G. // *Harmful Algae*. 2020. V. 97. P. 101857. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2020.101857>
129. Saidur M.R., Abdul Aziz A.R., Basirn W.J. // *Biosens. Bioelectron*. 2017. V. 90. P. 125–139. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.11.039>
130. Oliveira V., Polónia A.R.M., Clary D.F.R., Huang Y.M., de Voogd N.J., da Rocha U.N., Gomes N.C.M. // *Mol. Ecol. Resour*. 2021. V. 21. P. 110–121. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13248>
131. Yao Y., Nishimura M., Murayama K., Karanobu N., Tojo S., Beppu M., Ishige T., Itoga S., Tsuchida S., Mori M., Takayanagi M., Yokoyama M., Yamataga K., Kishita Y., Okazaki Y., Nomura F., Matsushita K., Tanaka T. // *Sci. Rep*. 2019. V. 9. P. 17411. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53449-y>
132. Sohrab S.S. // *Saudi J. Biol. Sci*. 2020. V. 27. P. 222–228. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.08.015>
133. Song S., Wang X., Xu K., Li Q., Ning L., Yang X. // *Anal. Chim. Acta*. 2019. V. 1052. P. 153–162. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.11.047>
134. Jeon H., Han S., Kim H., Lee J.B. // *J. Ind. Eng. Chem*. 2019. V. 70. P. 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2018.10.013>
135. Jeon H., Nam H., Lee J.B. // *Pharmaceutics*. 2019. V. 11. P. 387. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11080387>
136. Sun W., Ji W., Hall J.M., Hu Q., Wang C., Beisel C.L., Gu Z. // *Angew. Chem. Int*. 2015. V. 54. P. 12029–12033. <https://doi.org/10.1002/anie.201506030>
137. Оскорбин И.П., Швелёв Г.Ю., Проняева К.А., Степанов А.А., Пышный Д.В., Филипенко М.Л. // *Вопросы биол. мед. фарм. химии*. 2020. Т. 23. С. 3–10. <https://doi.org/10.29296/25877313-2020-12-01>
138. Макарова Ю.А., Фомичева К.А., Осипьянц А.И., Шкурников М.Ю., Покрыщенко А.А., Тоневцкий Е.А., Вечорко В.И. // *Биотехнология*. 2020. Т. 36. № 5. С. 6–12. <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2020-36-5-6-12>
139. Хафизов К.Ф., Петров В.В., Красовитов К.В., Золкина М.В., Акимкин В.Г. // *Вопросы вирусологии*. 2021. Т. 66. № 1. С. 17–28. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-42>

Rolling Circle Amplification as a Universal Method for Analysis of a Wide Range of Biological Targets

R. R. Garafutdinov*, #, A. R. Sakhabutdinova*, A. R. Gilvanov*, and A. V. Chemeris*

#Phone: +7 (347) 235-60-88; e-mail: garafutdinovr@gmail.com

*Institute of Biochemistry and Genetics, UFRS RAS, prosp. Octyabrya 71, Ufa, 450054 Russia

Detection and quantification of biological targets is an important task that solved using a wide range of analytical methods. Recently, methods based on isothermal amplification of nucleic acids (NA) have been developed. Among them, rolling circle amplification (RCA), which is used for the detection of specific NA and the analysis of other biomolecules, has gained more attention and become a universal platform for the elaboration of highly sensitive techniques and portable diagnostic devices. This review discloses a number of methodological points of RCA-based analysis. It provides data on key molecular agents, describes ways to increase the efficiency and productivity of RCA and briefly characterizes the types of used reporters. The differences in the RCA-based analysis of some biological targets are shown. The examples of the use of various RCA-techniques for solving specific diagnostic problems are given.

Keywords: isothermal amplification, rolling circle amplification, C-probe, circular target, polymerase, analyte, nucleic acids, microRNA, proteins