

УДК 543.94

ИЗОТЕРМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АМПЛИФИКАЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В БИОАНАЛИЗЕ

Обзор

© 2020 О.Л. Бодулев, И.Ю. Сахаров*

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет,
119991 Москва, Россия; электронная почта: sakharovivan@gmail.com

Поступила в редакцию 13.08.2019

После доработки 01.11.2019

Принята к публикации 01.11.2019

В последние годы бурно развиваются методы изотермической амплификации нуклеиновых кислот как альтернатива полимеразной цепной реакции (ПЦР). Их использование позволяет проводить амплификацию нуклеиновых кислот при постоянной температуре в отличие от ПЦР, для которой требуется циклическое изменение температуры. Кроме того, при использовании изотермических методов амплификация может проводиться непосредственно в живых клетках. В настоящем обзоре в краткой форме изложены принципы известных изотермических методов амплификации, а также продемонстрирована их высокая эффективность при конструировании новых высокочувствительных методов анализа как нуклеиновых кислот, так и ферментов, ответственных за их модификацию. Более того, приведены данные об успешном использовании изотермических методов амплификации в анализе клеток и биомолекул, определение которых проводится с применением ДНК/РНК-аптамеров.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: нуклеиновые кислоты, амплификация, изотермическая, биоанализ, аптамеры.

DOI: 10.31857/S0320972520020037

Количественное и качественное определение нуклеиновых кислот является чрезвычайно важным направлением в современной биологии и медицине. Начиная с 1990-х гг., данная область науки активно развивается, и, вероят-

но, число исследований в этой области будет продолжать расти в следующие десятилетия. Обнаружение ДНК/РНК патогенных бактерий и вирусов может иметь решающее значение для выбора правильной стратегии лечения пациентов. Недавние открытия указали на взаимосвязь между восприимчивостью людей к некоторым заболеваниям и однонуклеотидными полиморфизмами или короткими вставками/делециями. Также было показано, что гены микроРНК человека часто встречаются вблизи геномных регионов и сайтов, связанных с раком. Уровень экспрессии некоторых микроРНК у пациентов с хроническим лимфолейкозом, колоректальной неоплазией, лимфомой Беркитта, раком легких, крупноклеточными лимфомами, глиобластомой и другими заболеваниями отличается от уровня экспрессии в нормальных тканях.

Помимо врачей в развитии высокочувствительных методов анализа нуклеиновых кислот чрезвычайно заинтересованы специалисты пищевой химии, т.к. эти методы с большой достоверностью и точностью позволяют проводить оценку качества пищевых продуктов [1]. Методы анализа нуклеиновых кислот также давно и успешно используются в криминалистике [2].

Принятые сокращения: LAMP – петлевая изотермическая амплификация (Loop-mediated isothermal Amplification); NASBA – метод амплификации, основанный на последовательности нуклеиновых кислот (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification); HDA – хеликаза-зависимая амплификация (Helicase-Dependent Amplification); EXPAR – экспоненциальная реакция амплификации нуклеиновых кислот (Exponential Amplification Reaction); SDA – амплификация с замещением цепи (Strand-Displacement Amplification); RPA – рекомбиназная полимеразная амплификация (Recombinase Polymerase Amplification); RCA – метод катящегося кольца (Rolling Circle Amplification); WGA – полногеномная амплификация (Whole Genome Amplification); MDA – амплификация со множественным замещением цепи (Multiple Displacement Amplification); pWGA – полногеномный метод амплификации с применением праймазы (Primase-based Whole Genome Amplification); EASA – метод экзонуклеаза III-зависимой циклизации аналита (Exonuclease III-Assisted Signal Amplification); ICS DP – амплификационный метод с полимеризацией и замещением (Isothermal Circular-Strand-Displacement Polymerization); HCR – реакция цепной гибридизации (Hybridization Chain Reaction); CHA – метод каталитической сборки шпильки (Catalytic Hairpin Assembly).

* Адресат для корреспонденции.

Обнаружение последовательностей нуклеиновых кислот без предварительной очистки в биологических образцах и непосредственно в живых организмах является крайне актуальной задачей. В основе таких методов анализа лежит реакция гибридизации, что определяет их высокую селективность. С учетом того, что концентрации нуклеиновых кислот в исследуемых образцах практически всегда крайне низкие, а их изменения в случае патологии могут быть незначительными, требуются методы с чрезвычайно высокой чувствительностью и низким пределом обнаружения. Для этого в настоящее время детектирующие методы анализа ДНК/РНК сопрягаются с различными вариантами полимеразной цепной реакции (ПЦР). Данный метод широко используется на практике и является высокоэффективным, т.к. он позволяет синтезировать до 10^9 копий (ампликонов) анализируемой последовательности. Однако данный метод имеет ряд недостатков. Так, при проведении ПЦР возможна неспецифическая гибридизация, приводящая к накоплению посторонних продуктов.

Для количественного определения нуклеиновых кислот широко используется ПЦР с детекцией продукта в режиме реального времени (ПЦР-РВ) [3]. Существуют два основных варианта ПЦР-РВ. В первом варианте используется Taq ДНК-полимераза и линейный зонд (технология TaqMan), во втором варианте – интеркалирующие красители, такие как SYBR Green, Eva Green, VOXTO и др., флуоресценция которых значительно возрастает при их связывании с двухцепочечной молекулой ДНК. Линейный диапазон ПЦР-РВ лежит в диапазоне от 10 до $5 \cdot 10^9$ копий анализируемой последовательности [4]. Чувствительность метода сильно варьирует и зависит от структуры использованных праймеров. Для ПЦР-РВ характерна высокая воспроизводимость.

Циклическое изменение температуры, требуемое при проведении методов с применением ПЦР, способствует неспецифической гибридизации праймеров и ампликонов [5]. Более того, для осуществления циклического изменения температуры в ходе ПЦР необходимо использование дорогостоящего оборудования. Следует также отметить, что в силу необходимости проведения дуплексного плавления в ходе ПЦР, которое проводится путем нагревания, данный метод не может быть использован для обнаружения нуклеиновых кислот в живых клетках.

Вышеупомянутые ограничения ПЦР стимулировали разработку различных изотермических амплификационных платформ для обнаружения ДНК/РНК. Целью данного обзора явля-

ется описание известных к настоящему времени изотермических методов амплификации, их преимуществ и ограничений применения в биоанализе.

Описанные к настоящему времени изотермические методы амплификации нуклеиновых кислот можно разделить на две группы: 1) методы амплификации, осуществляющие повышение аналитического сигнала за счет увеличения концентрации аналита; 2) методы амплификации, позволяющие повышать аналитический сигнал без изменения концентрации аналита.

МЕТОДЫ АМПЛИФИКАЦИИ, ОСУЩЕСТВЛЯЮЩИЕ ПОВЫШЕНИЕ АНАЛИТИЧЕСКОГО СИГНАЛА ЗА СЧЕТ УВЕЛИЧЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ АНАЛИТА

Во всех методах изотермической амплификации, направленных на повышение концентрации аналита, используются ферменты.

На рис. 1, а приведена схема **петлевой изотермической амплификации (LAMP)**. Данный метод впервые был описан Notomi et al. в 2000 г. [6]. В этом методе используются несколько праймеров (чаще четыре, но иногда и шесть), комплементарных разным участкам определяемой ДНК, а также ДНК-полимеразы с высокой способностью к замещению цепей. LAMP проводится при температуре 60°C .

Данная реакция инициируется прямым внутренним праймером, который на первом этапе гибридизуется с комплементарным фрагментом молекулы ДНК-аналита, расположенным в районе 5'-конца, а затем достраивается ДНК-полимеразой. На следующем этапе прямой внешний праймер гибридизуется с 5'-концевым фрагментом аналита, после чего также элонгируется полимеразой, при этом вытесняя ранее синтезированную последовательность. Затем обратный внутренний праймер взаимодействует с комплементарным участком вновь синтезированной последовательности, расположенным вблизи 3'-конца. После достраивания этого праймера с синтезированной последовательностью ДНК гибридизуется обратный внешний праймер, который также ферментативно достраивается, при этом вытесняя ранее синтезированную последовательность. На концах обеих синтезированных последовательностей за счет комплементарных взаимодействий формируются петлеобразные структуры. Таким образом, в результате проведения указанных выше реакций синтезируются две структуры с петлями на обоих концах. Получение таких молекул инициирует последующие циклы ампли-

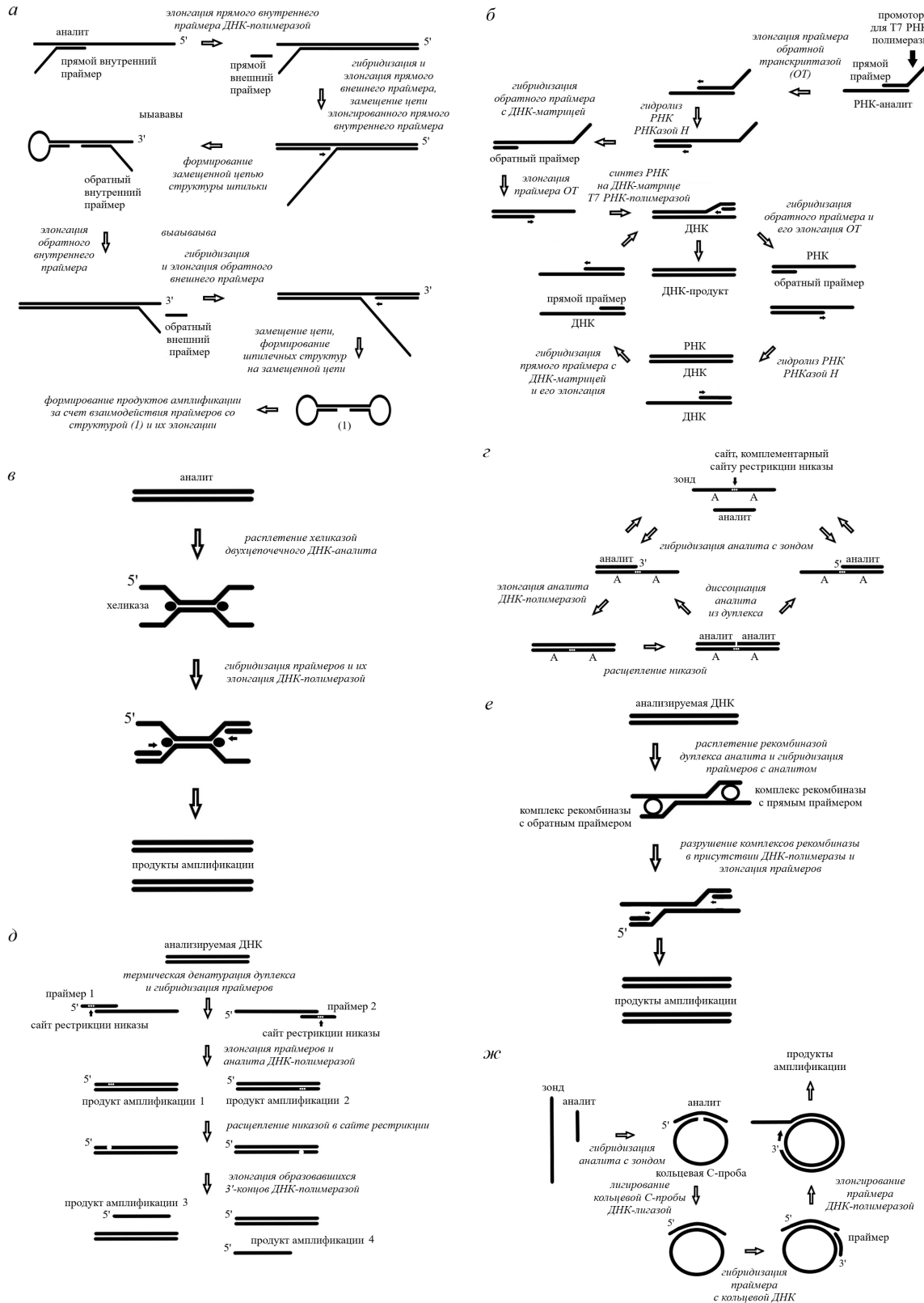


Рис. 1. Схемы изотермических методов амплификации нуклеиновых кислот с применением полимераз: *а* – петлевая изотермическая амплификация ДНК (LAMP); *б* – метод амплификации, основанный на последовательности нуклеиновых кислот (NASBA); *в* – хеликаза-зависимая амплификация ДНК (HDA); *г* – экспоненциальная реакция амплификации нуклеиновых кислот (EXPAR); *д* – метод амплификации с замещением цепи (SDA); *е* – рекомбиназная полимеразная амплификация (РПА); *ж* – амплификация по принципу катящегося кольца (RCA)

лификации с использованием тех же праймеров [7].

Амплификация LAMP носит экспоненциальный характер и позволяет получить до 10^9 копий ДНК в течение 15–60 мин. Использование нескольких праймеров обеспечивает высокую специфичность копирования. При применении обратной транскрипции LAMP позволяет также амплифицировать молекулы РНК.

Продукты реакции, образующиеся в LAMP, чаще всего регистрируются либо с помощью электрофореза, либо по измерению мутности среды, которая изменяется в результате образования пирофосфата магния [8]. Концентрация образующегося в ходе LAMP пирофосфата может также оцениваться с помощью флуоресцентного красителя кальцеина (флуорексона) [9]. Для детекции образовавшейся ДНК используется интеркалирование различных красителей [10, 11]. Благодаря своей простоте, LAMP прекрасно сочетается с микрофлюидными технологиями, что позволяет автоматизировать метод с одновременным уменьшением времени анализа, а также сократить расход реагентов [11].

LAMP широко используется как скрининговый метод, т.к. он проводится при постоянной температуре, а также является высокоэффективным и специфичным. В литературе описано применение LAMP для выявления палочки Коха, герпеса, тяжелого острого респираторного синдрома, сибирской язвы, а также вирусов гриппа человека, птицы и др. [12, 13]. Метод, разработанный для определения *Leptospira* с применением LAMP, позволил детектировать ДНК данного патогена в концентрации от 200 пг/мл. Специфичность, оценка которой проводилась с использованием 172 бактериальных штаммов, составила 100% [12].

С помощью LAMP диагностируются не только бактериальные патогены и вирусы, но также и заболевания, вызываемые простейшими. Одним из таких патогенов является малярийный плазмодий. В исследовании Poschl et al. [14] в качестве метода сравнения был использован метод ПЦР, специфичность LAMP для *Plasmodium falciparum* составила 100%. Все ПЦР-отрицательные образцы для данного возбудителя также были отрицательными при диагностике с помощью LAMP. При диагностике *Plasmodium vivax* методом LAMP обнаружены 22 из 23 ПЦР-положительных образцов. Все 82 ПЦР-отрицательных образца также были отрицательными в анализе с использованием LAMP. Таким образом, для диагностики видов *Plasmodium* применение метода LAMP так же оправданно, как и ПЦР. К сожалению, при использовании LAMP в некоторых случаях были

зарегистрированы ложноположительные результаты [15]. LAMP также был успешно применен для выявления *in situ Salmonella* в пищевых продуктах и *stxA₂* в *Escherichia coli* O157:H7 [15a, 15б].

Недавно при исследовании штаммов *Burkholderia mallei* и *Burkholderia pseudomallei* было показано, что с помощью LAMP праймеры выявляли ДНК не всех анализируемых штаммов, к генам-мишеням которых они были смоделированы, но были способны направлять синтез фрагментов генов гетерологичных штаммов [16]. По мнению авторов, неудовлетворительные результаты, полученные при проведении LAMP, могут быть обусловлены наличием GC-богатых областей в геноме исследованных бактерий и формированием вторичных структур при температуре проведения LAMP.

Следует отметить, что LAMP проявляет более высокую специфичность относительно ПЦР за счет использования как минимум шести участков связывания праймера с анализируемой последовательностью. Утверждается, что чувствительность LAMP выше чувствительности ПЦР на порядок. Более того, LAMP менее чувствительна к ингибиторам, присутствующим в биологических образцах [17]. Серьезным недостатком данного метода является высокий риск контаминации, часто приводящий к получению ложноположительных результатов в отрицательных контролях [18].

Другим изотермическим методом амплификации нуклеиновых кислот, приводящим к повышению концентрации аналита, является **метод амплификации, основанный на последовательности нуклеиновых кислот*** (NASBA). В этом методе, разработанном Дж. Комптоном в 1991 г., амплификация молекул РНК проводится при участии трех ферментов, таких как обратная транскриптаза вируса миелобластома птиц, РНКазы H и T7 РНК-полимераза [19]. NASBA включает в себя две стадии: ациклическую и циклическую (рис. 1, б).

На первой стадии денатурированная при 65 °С РНК взаимодействует со специфическим праймером, содержащим промоторную последовательность T7 РНК-полимеразы. В присутствии обратной транскриптазы фермент синтезирует последовательность ДНК по одноцепочечной РНК, формируя гибрид РНК/ДНК. Данная реакция, как и все последующие, проводится обычно при 41 °С. Полученный гибрид

* Хотя, по мнению авторов, название данного метода является чрезвычайно неинформативным, именно оно используется в научной англоязычной литературе. Более верно, с нашей точки зрения, было бы назвать его *методом изотермической амплификации РНК, основанным на последовательности нуклеиновых кислот*.

подвергается расщеплению РНКазой H, а образующаяся однонитевая ДНК реагирует со вторым праймером, который достраивается с образованием двухцепочечной ДНК. Далее при участии T7 РНК-полимеразы на матрице ДНК синтезируются РНК, комплементарные анализируемой ДНК. Образующиеся молекулы РНК взаимодействуют со вторым праймером, в процессе достраивания он образует гибрид РНК/ДНК, который, в свою очередь, расщепляется РНКазой H. На этом этапе образующаяся одноцепочечная ДНК реагирует с первым праймером, который удлиняется в присутствии обратной транскриптазы, а T7 РНК-полимераза синтезирует копии исходной РНК, благодаря чему происходит запуск следующего цикла амплификации.

Преимуществом NASBA относительно ПЦР с обратной транскрипцией является использование одной и той же реакционной среды для реакции обратной транскрипции и последующей реакции амплификации. Показано, что NASBA обладает большей чувствительностью и является менее затратным по времени, чем ПЦР. Эффективность этого экспоненциального метода составляет 10^9 копий анализа. Следует отметить, что, несмотря на высокую эффективность экспоненциальных амплификационных методов, для них характерна неспецифическая амплификация, которая приводит к получению ложноположительных результатов.

Сразу после разработки NASBA был применен для диагностики ВИЧ-инфекции в сыворотке крови пациентов [20]. В настоящее время данный метод широко используется при выявлении бактерий рода *Salmonella*, вирусов гепатита и папилломы, энтеровирусов человека. NASBA был также применен для определения мРНК и микроРНК [21, 22].

Обычно продукты NASBA регистрируются методом электрофореза с использованием этидия бромидом. Также применяются микрофлюидные системы и биочипы с использованием зондов, меченных флуоресцентными красителями или пероксидазой [11, 21]. С использованием в качестве метки пероксидаза-подобного ДНКзима NASBA был применен для детекции и дифференциации штаммов вируса чумы свиней [23]. NASBA используется и в сочетании с методом планшетного олигонуклеотидного анализа. Такой подход был успешно применен для определения реовируса белого амура [24]. Разработанный метод способен специфически детектировать 14 копий/мкл в течение 5 ч.

Следует отметить, что в случае применения NASBA довольно часто регистрируются ложноположительные и ложноотрицательные результаты. В то же время NASBA менее чувствителен

к ингибиторам, присутствующим в биологических образцах, чем ПЦР [25].

Хеликаза-зависимая амплификация (HDA) является аналогом ПЦР, расплетение цепей ДНК проводится не за счет повышения температуры, а под действием хеликазы (рис. 1, в) [26]. В этом методе используются хеликаза, ДНК-полимераза и белки, связывающие одноцепочечные ДНК. На первом этапе амплификационного цикла к обоим концам двухцепочечной ДНК присоединяются молекулы хеликазы, что приводит к расплетению дуплекса. С высвобожденной из дуплекса однонитевой ДНК, стабилизированной ДНК-связывающими белками, гибридизуются прямой и обратный праймеры, после чего в присутствии ДНК-полимеразы осуществляется их элонгация. Таким образом, при завершении первого цикла HDA из одной молекулы ДНК образуется две. В дальнейшем этот процесс многократно повторяется, приводя к увеличению концентрации исследуемого анализа. Данный метод характеризуется экспоненциальной кинетикой амплификации, его эффективность достигает 10^7 копий анализа [27]. Следует отметить, что HDA обычно проводится при двух температурах: при 37°C или в интервале между 60 и 65°C . При пониженной температуре применяется репаративный белок MutL, в то время как при более высоких температурах использование данного белка не требуется. Следует отметить, что понижение температуры проведения амплификации повышает концентрацию неспецифических продуктов амплификации, что, в свою очередь, может приводить к появлению ложноположительных результатов [28].

Важно отметить, что степень фоновой амплификации в HDA выше, чем в ПЦР [29]. Для минимизации взаимодействия праймеров между собой описаны способы их модификации [30]. Другой подход для минимизации фоновой амплификации – использование таких соединений, как диметилсульфоксид, бетаин, сорбитол, которые, к сожалению, также могут ингибировать и полимеразу. Для той же цели используются высокомолекулярные краудинг-агенты, такие как, например, полиэтиленгликоль. Они повышают эффективность полимеразы, одновременно уменьшая степень взаимодействия праймеров между собой [28].

При сравнении методов HDA с флуоресцентной детекцией и ПЦР-РВ было показано, что при использовании ПЦР-РВ наблюдаются меньшие значения предела обнаружения анализа, а полученные концентрационные зависимости лучше линеаризуются. Так, при анализе ДНК *Mycobacterium tuberculosis* методом HDA

предел обнаружения составил 1 фМ, в то время как для ПЦР-РВ – 100 аМ [28].

Описано применение метода НДА в клиническом анализе для выявления различных бактериальных и вирусных инфекций, а также патогенов в воде и пище. Обычно продукты НДА регистрируются методом электрофореза с применением этидия бромиды. Кроме того, применяются латеральные проточные методы, биочипы и электрохимические биосенсоры. Так, в работе Tang et al. [31] метод НДА был использован в сочетании с латеральным проточным методом для определения *Salmonella typhimurium* в воде, предел обнаружения составил 100 КОЕ/мл.

Метод НДА с электрохимической детекцией сигнала был использован для количественного определения бактерий рода *Salmonella* [32]. Молекулы захватывающей ДНК иммобилизовали на поверхности электрода, а один из праймеров модифицировали флуоресцеином. В качестве детектирующей системы использовали конъюгат антител против флуоресцеина с пероксидазой хрена. Предел обнаружения составил 10 копий ДНК.

Данный метод был применен также для детекции патогена *Phytophthora kernoviae* в листьях растений с использованием ДНК-чипов [33]. В этом случае предел обнаружения составил 10 нг/мл. Объединение НДА и планшетного олигоферментного анализа позволило разработать колориметрический метод для идентификации и количественного определения *Karlotinium veneficum* и *Karlotinium armiger* [34]. Предел обнаружения данного метода составил 50 КОЕ/мл. Разработанный метод был применен для выявления *Karlotinium* spp. в морской воде.

Кроме детекции патогенов НДА был успешно использован при разработке метода анализа микроРНК, перспективных онкомаркеров. Так, Ma et al. [35] описали чувствительный флуоресцентный метод определения микроРНК miR-21. Предел обнаружения этого метода составил 12,8 фМ, линейный диапазон – от 100 фМ до 10 нМ.

В методе, получившем название **экспоненциальная реакция амплификации нуклеиновых кислот (EXPAR)** [36], используется зонд, который представляет собой две одинаковые последовательности, комплементарные анализируемой нуклеиновой кислоте и соединенные между собой через сайт рестрикции никазы (рис. 1, з). В процессе определения аналит гибридизуется с одной из копий зонда с образованием дуплексов двух типов. Один из дуплексов, в котором аналит присоединен к 5'-концу зонда, не может быть элонгирован полимеразой и достаточно быстро диссоциирует при температуре проведения EXPAR (60 °С). В другом дуплексе аналит

присоединен к 3'-концу зонда, что позволяет ДНК-полимеразе элонгировать анализируемую последовательность. При образовании дуплекса завершается формирование специфического сайта расщепления никазы. Последующий ферментативный гидролиз дуплекса никазой приводит к его диссоциации с появлением дополнительной копии аналита. В EXPAR широко используются никазы Nt.BbvCI, Nb.BbvCI, AlwI, Nt.AlwI, Nb.BssSI, Nt.BsmAI и Nb.BtsI.

В следующем цикле повторно происходит элонгация аналита ДНК-полимеразой и расщепление синтезированной последовательности никазой. В EXPAR используются такие коммерчески доступные ферменты, как полимеразы phi 29, фрагмент Кленова, полимеразы Vent и Bst, у которых отсутствует 3'–5' экзонуклеазная активность. Хотя оптимальным температурным интервалом для проведения EXPAR является 55–60 °С, эта реакция может проводиться и при 37 °С. В последнем случае предпочтительно использовать фрагмент Кленова [36]. Более высокая температура амплификации повышает эффективность и специфичность EXPAR.

Таким образом, EXPAR осуществляет экспоненциальное накопление молекул аналита. Следует отметить, что данный метод амплификации может использоваться исключительно для амплификации коротких олигонуклеотидов и позволяет достигать эффективности 10⁸ копий аналита [27].

В отличие от других методов амплификации, в которых короткие праймеры используются в высокой концентрации, в данном методе в высокой концентрации применяется зонд, по длине превосходящий анализируемую последовательность в 2 раза. В связи с этим возможна димеризация зонда с последующим образованием неспецифических продуктов амплификации. Степень фоновой амплификации зависит от строения используемых зондов. Так, наличие в зонде фрагментов, обогащенных нуклеотидами G и A, может усугублять фоновую амплификацию в силу связывания полимераз с пуриновыми основаниями. Отмечается, что фоновая амплификация может быть также следствием формирования зондом структуры шпильки. На сегодняшний день не разработан эффективный способ подавления фоновой амплификации в EXPAR [36].

Впервые использование EXPAR для детекции ДНК-олигонуклеотидов было описано в 2003 г. [37]. Впоследствии EXPAR был применен для повышения чувствительности флуоресцентного метода количественного определения фрагмента мРНК гена *p53*. Предел обнаружения при его детекции в реальном времени составил

10 фМ, рабочий диапазон – от 10 фМ до 10 нМ [38]. В работе Li et al. [39] сочетание колориметрического метода детекции с использованием золотых наночастиц и EXPAR было применено для анализа микроРНК. Достигнутый предел обнаружения составил 46 фМ, линейный диапазон – от 50 фМ до 10 нМ. Кроме того, EXPAR был успешно применен для детекции метилирования ДНК и мутаций РНК.

EXPAR с использованием аптамеров был применен для определения белковых молекул, а именно тромбина, тромбоцитарного фактора роста и муцина 1 [36, 40]. Этот метод также использовался для определения катионов ртути, предел обнаружения которых составил 100 пМ [41].

Метод EXPAR позволяет повысить чувствительность методов определения некоторых ферментов. Описаны методы определения активности теломеразы (в клетках HeLa) [42], метилтрансферазы и урацил-ДНК-гликозидазы [36, 43].

Механизм метода амплификации с замещением цепи (SDA), впервые описанного в 1992 г., основан на циклической реакции, включающей в себя стадии полимеризации, расщепления и замещения [44]. Схема SDA представлена на рис. 1, д. На первой стадии осуществляется термическая денатурация двухцепочечной ДНК при 95 °С (остальные этапы SDA проводятся при 37 °С). Это позволяет праймерам сформировать комплексы с каждой из дочерних цепей. Следует отметить, что фрагменты 5'-концов используемых праймеров, не взаимодействующие с ДНК-аналитом, содержат сайт расщепления никазы. Фрагмент Кленова (без экзонуклеазной активности) катализирует удлинение 3'-концов последовательностей ДНК, приводя к образованию дуплексов с активным сайтом расщепления никазы. В результате ферментативного гидролиза никазой образуются новые 3'-концевые последовательности, что инициирует реакцию полимеризации с одновременным замещением дочерней анализируемой цепи. Данный процесс повторяется многократно. Таким образом, в ходе SDA происходит экспоненциальная аккумуляция анализируемых последовательностей. При использовании в рамках данного метода одного праймера вместо двух происходит линейная амплификация. SDA позволяет достигать эффективности, равной 10^7 копий аналита [27].

Как и другие методы амплификации, SDA применяется для детекции геномной ДНК. Анализ таких сложных образцов, содержащих бактерии и вирусы, как кровь человека, успешно проводится с помощью SDA, что указывает на

перспективность его использования в медико-биологических исследованиях.

За счет своей высокой специфичности данный метод амплификации был успешно применен для выявления однонуклеотидных полиморфизмов. Так, в работе Shi et al. [45] описан хемилюминесцентный метод детекции точечных мутаций. Использование в данном методе магнитных частиц позволило значительно понизить величину предела обнаружения (0,1 фМ).

SDA может применяться для определения высокомолекулярных РНК, состоящих из сотен и даже тысяч нуклеотидов, таких как вирусная РНК, мРНК и рРНК. Zhao et al. предложили двухэтапные колориметрический и флуоресцентный методы, в которых сначала проводится расщепление РНК ДНКзимом, а затем амплификация с помощью SDA [46]. Этот метод был также применен для количественного определения микроРНК и раковых клеток [47, 48]. При детекции микроРНК предел обнаружения составил 16 фМ, линейный диапазон – от 16 фМ до 100 нМ. Предел обнаружения клеток Рамоса был равен 45 клеток/мл, а линейный диапазон данного метода – 45–1000 клеток/мл.

На основе SDA Ding et al. [49] разработали чувствительный метод определения активности теломеразы. Этот флуоресцентный метод с использованием молекулярного маяка позволил измерить активность теломеразы, содержащейся в четырех клетках HeLa.

В последние годы для аналитических целей активно применяются аптамеры. В связи с тем, что аптамеры по своей химической природе являются ДНК/РНК-олигонуклеотидами, такие методы анализа пытаются комбинировать с методами амплификации нуклеиновых кислот. Описаны методы, основанные на взаимодействии аптамеров с тромбином и кокаином, чувствительность данных методов была существенно повышена за счет применения SDA [50, 51]. Поскольку в настоящее время описано большое число аптамеров к различным молекулам, такой подход представляется достаточно перспективным.

Рекомбиназная полимеразная амплификация (RPA) – еще один изотермический метод амплификации нуклеиновых кислот [27, 52]. Начиная с 2006 г., когда Найл Армес впервые описал RPA [53], интерес к нему растет год от года. В этом методе на первом этапе амплификационного цикла происходит образование комплекса рекомбиназы с прямым и/или обратным праймером (рис. 1, е). В присутствии комплементарной праймеру последовательности фермент расплетает дуплекс, что позволяет праймеру специфически вступать во взаимодействие с аналитом.

Осуществлению этой реакции содействуют ДНК-связывающие белки. В присутствии ДНК-полимеразы со способностью к замещению цепи происходит разрушение рекомбиназного комплекса, а полимеразы связывается с двухцепочечной ДНК и элонгирует праймер с 3'-конца. Вновь синтезированный дуплекс служит матрицей для следующего цикла. При использовании двух праймеров (прямого и обратного) по окончании реакции образуются два полуконсервативных дуплекса. Таким образом, RPA характеризуется экспоненциальным типом амплификации. Следует отметить, что при использовании одного праймера наблюдается линейный тип амплификации.

RPA может проводиться при 22–45 °С, но оптимальное значение температуры лежит в интервале 37–42 °С [52]. Для амплификации используются как одноцепочечные, так и двухцепочечные ДНК, а также метилированные ДНК. Как было продемонстрировано, RPA может проводиться в присутствии ингибиторов ПЦР, таких как гепарин, этанол и гемоглобин [53]. Это, в отличие от ПЦР, позволяет проводить амплификацию непосредственно в биологических образцах (таких как молоко, моча, кал, плевральная жидкость) после предварительного термического лизиса [54]. В то же время RPA ингибируется такими детергентами, как SDS и СТАВ.

RPA проводится как в гомогенной, так и в гетерогенной средах. В случае гетерогенной амплификации один или оба праймера иммобилизуются на твердой поверхности. Несмотря на высокую скорость гомогенной амплификации, гетерогенный подход активно развивается, т.к. в большинстве случаев он позволяет предотвращать матричный эффект и развивать более чувствительные методы анализа. Также отмечается, что применение RPA в гетерогенном формате позволяет уменьшить степень неспецифической амплификации [55].

Хотя RPA – метод быстрый и чувствительный, высокое значение фонового сигнала часто является проблемой при его использовании. Для устранения этого негативного эффекта используется праймер, который содержит сайт расщепления для специфической эндонуклеазы *E. coli* IV (Nfo), которая распознает и расщепляет этот участок в дуплексах [52]. Этот праймер может быть использован на стадии удлинения ДНК-полимеразой только после того, как он был расщеплен эндонуклеазой с появлением гидроксильной группы на 3'-конце. Праймер может быть конъюгирован с флуорофором и тушителем, так что реакция его расщепления сопровождается усилением флуоресценции. Этап

расщепления с помощью эндонуклеазы в RPA служит дополнительным этапом, позволяющим уменьшить фоновый сигнал. Отмечается, что RPA и ПЦР сопоставимы по эффективности. Метод позиционируется как наиболее быстрый среди прочих методов амплификации [54].

Описано использование RPA в сочетании с различными методами детекции для определения различных патогенов. Так, в работе Mauboroda et al. [55] данный метод был использован для определения ДНК *Y. pestis*. При этом прямой праймер был иммобилизован в лунках планшета для иммуоферментного анализа, а обратный праймер модифицирован биотином, который впоследствии использовался для присоединения конъюгата пероксидазы со стрептавидином. С использованием колориметрического субстрата пероксидазы (3,3',5,5'-тетраметилбензидина) достигнут предел обнаружения 0,3 фМ. Линейный диапазон при этом составлял от 10 фМ до 10 нМ.

Следует отметить, что метод RPA часто сочетается с электрохимическим методом детекции. С помощью такого подхода Ng et al. [56] смогли разработать амперометрический биосенсор, позволяющий определять 1 КОЕ ДНК *Mycobacterium tuberculosis*. В другом электрохимическом методе в качестве медиатора использовали комплекс рутения $[Ru(NH_3)_6]^{3+}$, который был интеркалирован в двухцепочечную ДНК [57]. Предел обнаружения аналита предложенным методом составил 11 КОЕ/мл.

Альтернативными электрохимическому методу детекции являются хемилюминесценция, флуоресценция и поверхностное комбинационное рассеяние. Недавно с применением RPA был сконструирован флуоресцентный сенсор в виде браслета, который способен определять специфическую ДНК вируса Зика в условиях реального времени [58].

Достаточно распространенным амплификационным методом, направленным на повышение концентрации детектируемой последовательности, является **метод катящегося кольца (RCA)**, разработанный в 1995 г. [59]. Как видно на рис. 1, ж, в основе этого метода лежит использование кольцевой ДНК. Кольцевая ДНК (С-проба) формируется при взаимодействии анализируемой последовательности с одноцепочечным ДНК-зондом, содержащим на своих концах последовательности, комплементарные аналиту. При формировании такого комплекса 5'- и 3'-концы соединяются в кольцо. Замыкание кольца происходит в результате лигирования сближенных концов С-пробы.

В дальнейшем кольцевая ДНК гибридизуется с праймером, который в присутствии ДНК-

полимеразы элонгируется, приводя к образованию последовательности, состоящей из многочисленных участков, повторяющих ДНК-аналит.

В RCA наиболее часто используются ДНК-полимеразы phi 29 и Bst. Обычно данная реакция проводится при 30–37 °С [60]. Линейная амплификация при постоянной температуре занимает от нескольких часов до нескольких дней, что приводит к синтезу многочисленных копий аналита. Эффективность RCA оценивается в 10^3 копий аналита.

Недавно описана модификация RCA, в которой в реакционную смесь также добавляется второй праймер, гибридизующийся с последовательностью, элонгированной с использованием первого праймера. Введение второго праймера приводит к тому, что амплификация приобретает экспоненциальный характер [60].

Метод RCA широко используется при разработке методов определения бактериальных и вирусных ДНК/РНК и микроРНК. Более того, RCA является высокоспецифическим методом за счет применения ДНК-лигазы, катализирующей лигирование лишь в случае точной координации 3'- и 5'-концевых последовательностей [61, 62], в связи с чем данный метод позволяет выявлять однонуклеотидные полиморфизмы [63].

В работе Schopf et al. [64] описано применение RCA при определении геномной ДНК *Mycobacterium tuberculosis*. На первом этапе ДНК обрабатывали рестриктазами и денатурировали при повышенной температуре. Далее производили иммобилизацию ее фрагментов за счет их гибридизации с захватывающими олигонуклеотидами, ковалентно связанными с частицами сефарозного геля. После проведения амплификации с помощью RCA в систему вносили комплементарные анализируемым фрагментам ДНК с флуоресцентными метками. Предел обнаружения описанного метода составил 4,3 фМ анализируемой ДНК и 10^4 КОЕ/мл *M. tuberculosis*. Продукты RCA определялись также за счет интеркалирования в дуплекс ДНК красителя SYBR Green. В случае определения микроРНК miR-let-7a предел обнаружения составил 10 фМ, линейный диапазон – от 25 фМ до 1 пМ аналита [65]. Кроме того, применение RCA позволило визуализировать микроРНК семейства let-7 непосредственно в живых раковых клетках легких A549 [66].

Регистрация процесса полимеризации RCA возможна и по накоплению в реакционной среде пирофосфата. В работе Mashimo et al. [67] с помощью аденилил-трансферазы пирофосфат трансформировали в АТФ, после чего определя-

ли концентрацию АТФ биолюминесцентным методом с помощью люциферазы. Предел обнаружения модельного РНК-аналита, определенный этим методом, составил 2 пМ, его линейный диапазон – от 2 пМ до 1 нМ.

RCA использовался для повышения чувствительности метода определения активности метилтрансферазы [68]. Разработанный метод позволил детектировать фермент с концентрацией $8,1 \times 10^{-5}$ ед/мл. Линейный диапазон данного метода лежит в диапазоне от 4×10^{-4} до 1×10^{-2} ед/мл. Также RCA успешно был применен для детектирования метилирования ДНК [69].

Следует отметить, что метод RCA может быть направлен на повышение аналитического сигнала как за счет повышения концентрации аналита, так и увеличения количества детектируемых меток.

Во всех методах амплификации, приводящих к повышению аналитического сигнала за счет повышения концентрации аналита, используются ДНК-полимеразы, уязвимые к действию ингибиторов, присутствующих в анализируемых образцах. Часто это может приводить к получению ложноотрицательных результатов. С другой стороны, фоновая амплификация, вызванная димеризацией используемых праймеров/зондов, может быть причиной ложноположительных результатов. Минимизировать указанные недостатки позволяет использование методов детекции, высокоспецифических к анализируемой последовательности.

Все вышеописанные методы амплификации были основаны на применении специфических последовательностей. Вместе с тем были разработаны и изотермические методы усиления с использованием случайных праймеров. Такие методы полногеномной амплификации (WGA) применяются для увеличения количества ДНК, необходимого для ее секвенирования.

Первый вариант WGA, получивший название **амплификации со множественным замещением цепи (MDA)**, был описан в 2001 г. [70]. Этот метод основан на использовании случайных гексамерных праймеров, взаимодействующих с кольцевыми геномами, что приводит к формированию многочисленных репликационных вилок. В MDA используется ДНК-полимераза Phi 29, которая характеризуется повышенной процессивностью и низкой частотой ошибок. Протекание каскада реакций MDA приводит к экспоненциальному накоплению двухцепочечных ДНК и 10^4 -кратному увеличению концентрации плазмидной ДНК в течение нескольких часов.

В 2002 г. этот метод был адаптирован для амплификации линейных геномов (рис. 2, а).

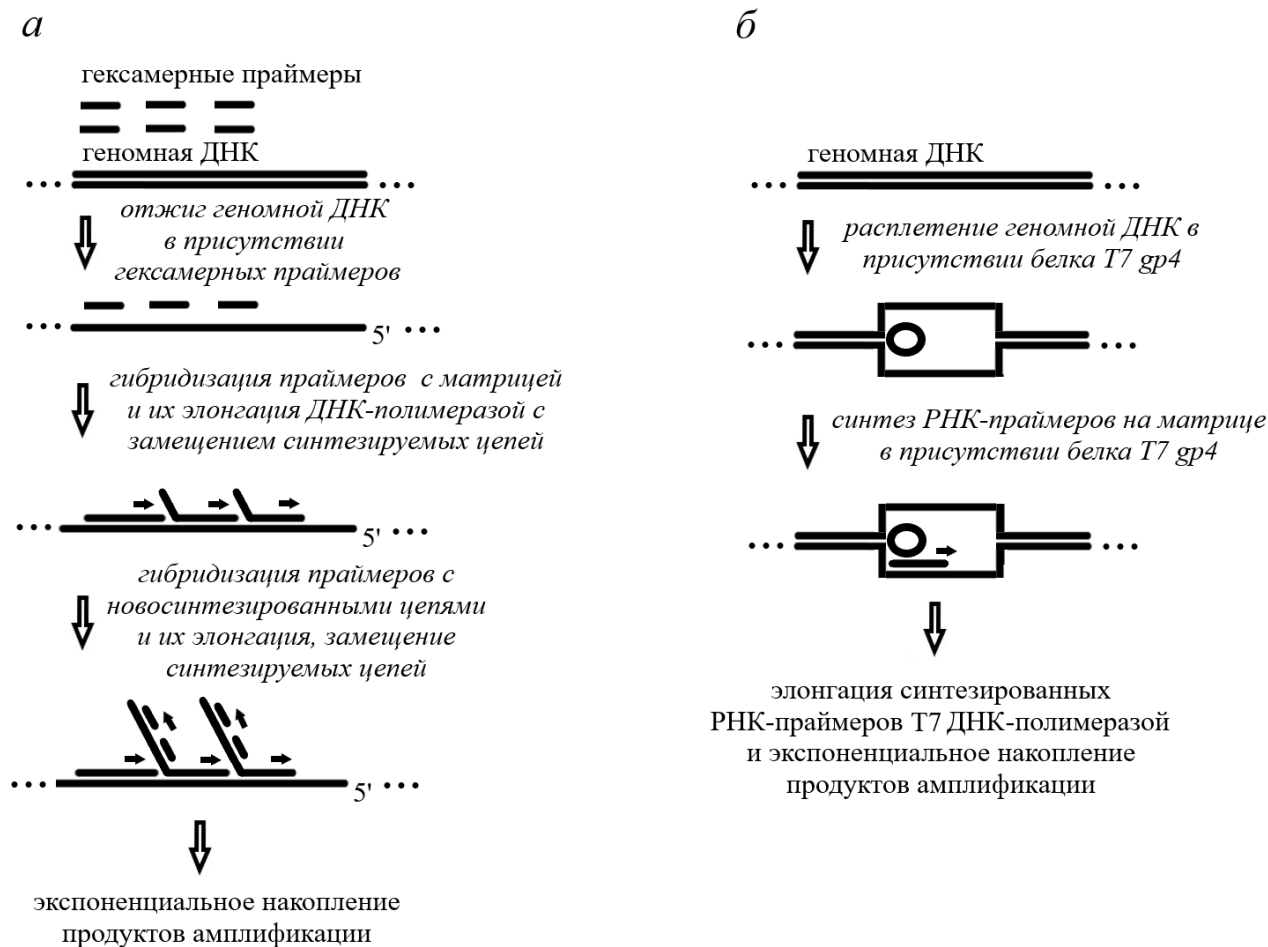


Рис. 2. Полногеномный метод амплификации: *а* – амплификация с множественным замещением цепи (MDA); *б* – полногеномный метод амплификации с применением праймазы

С применением данного метода наличие 1–10 копий геномной ДНК человека позволяет получить ~20–30 мкг ДНК со средней длиной ~10 кб, которые могут быть использованы для секвенирования и генотипирования.

Альтернативой WGA является **полногеномный метод амплификации с применением праймазы (pWGA)**, который имитирует репликацию ДНК бактериофага T7 *in vivo* [71]. В присутствии бифункционального белка T7 gp4, обладающего активностями и хеликазы, и праймазы, геномная ДНК расплетается, после чего синтезируется РНК-праймер, комплементарный одноцепочечной ДНК (рис. 2, б). Синтез ДНК катализируется T7 ДНК-полимеразой, обладающей высокой процессивностью. Как правило, при использовании pWGA в течение 1 ч при 37 °С образуется 1–10 нг геномной ДНК человека. Кольцевую ДНК также можно использовать в качестве матрицы в pWGA. При введении в анализ всего лишь 100 копий коэффициент амплификации достигает 10⁸. Следует отметить, что при

применении pWGA удается избежать тепловой денатурации геномной ДНК, которая проводится в MDA.

**МЕТОДЫ АМПЛИФИКАЦИИ,
 ОСУЩЕСТВЛЯЮЩИЕ ПОВЫШЕНИЕ
 АНАЛИТИЧЕСКОГО СИГНАЛА
 БЕЗ УВЕЛИЧЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ
 АНАЛИТА**

Для изотермических амплификационных методов, позволяющих повысить аналитический сигнал без изменения концентрации аналита, характерна линейная кинетика амплификации. Некоторые из них проводятся с применением ферментов, другие – без их участия, что, естественно, делает последние методы более дешевыми, а также лишает их недостатков, типичных для ферментативных методов. Далее будут рассмотрены и те, и другие методы, т.к. все они имеют свои преимущества и недостатки и ис-

пользуются при разработке аналитических методов.

Одним из изотермических амплификационных методов без изменения концентрации аналита является **метод экзонуклеаза III-зависимой циклизации аналита (EASA)** [7, 72]. Экзонуклеаза III — фермент семейства нуклеаз, катализирующий поэтапное удаление мононуклеотидов с 3'-гидроксилированных концов двухцепочечной ДНК путем гидролиза фосфодиэфирных связей [73], т.е. экзонуклеаза III обладает неспецифической 3'–5' экзонуклеазной активностью. Подходящими субстратами для проявления активности такого фермента являются ДНК с тупыми или утопленными 3'-концами. Следует отметить, что субстраты с выступающими 3'-концами при их удлинении на четыре или более нуклеотидов ферментативному расщеплению экзонуклеазой III не подвергаются.

В 2010 г. Plaxco et al. [74] впервые описали принцип EASA (рис. 3). Суть данного амплификационного метода заключается в том, что исследуемая нуклеиновая кислота гибридизуется с ДНК-зондом с образованием двухцепочечной структуры с тупым 3'-концом, что позволяет экзонуклеазе III катализировать поэтапное удаление мононуклеотидов с 3'-конца используемого зонда. В результате ферментативного гидролиза молекула аналита высвобождается и вступает во взаимодействие с другой молекулой зонда, что инициирует следующий цикл амплификации. Таким образом, одна молекула аналита может привести к образованию большого числа молекул, образующихся при гидролизе зонда. Если используемый зонд содержит в своей структуре некую метку, то регистрируемый аналитический сигнал будет амплифицирован. Амплификация обычно проводится при 25 или 37 °С.

Позднее подобные амплификационные методы были развиты с применением T7 экзонуклеазы и λ -эксонуклеазы [75], которые, в отличие

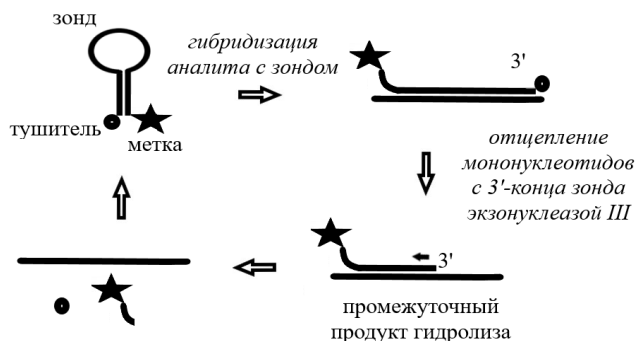


Рис. 3. Схема количественного анализа ДНК-олигонуклеотида с помощью амплификационного метода экзонуклеазы III-зависимой циклизации аналита (EASA)

от экзонуклеазы III, катализируют отщепление мононуклеотидов не с 3'-конца, а с 5'-конца используемого зонда.

В пионерской работе по EASA данный метод был применен для количественного определения модельного ДНК-олигонуклеотида [74]. В этой работе был использован молекулярный маяк, который содержал флуоресцентный краситель на 5'-конце и тушитель на одном из нуклеотидов, расположенных во внутренней области последовательности маяка. При этом за счет самогибридизации формировалась шпилька с выступающим концом, устойчивым к гидролизу экзонуклеазой III. Более того, закрытая структура шпильки удерживала флуорофор в непосредственной близости от тушителя, что приводило к регистрации лишь слабого сигнала флуоресценции. В присутствии ДНК-аналита шпильчатая структура маяка раскрывалась с образованием двухцепочечной структуры с тупым 3'-концом, что позволяло экзонуклеазе III катализировать удаление мононуклеотидов с этого конца, что, в свою очередь, приводило к высвобождению флуорофора и повышению интенсивности флуоресценции. Одновременно с этим освобожденный аналит взаимодействовал с другой молекулой молекулярного маяка, инициируя следующий цикл EASA. Таким образом, применение EASA позволило разработать простой флуоресцентный метод обнаружения ДНК-аналита.

Позднее было опубликовано большое число работ [76–80], в которых EASA применен для повышения чувствительности анализа нуклеиновых кислот, при этом на стадии детекции использовалась не только флуоресценция, но и электрохимия, колориметрия и хемилюминесценция.

Используя в качестве индикаторной реакции взаимодействие Hg^{2+} с тиминами, разработан метод с применением EASA для количественного определения ионов ртути, предел обнаружения которого составил 1 пМ Hg^{2+} , а линейный диапазон — от 10 пМ до 100 нМ [79]. Объединение в одном методе EASA и аптамеров позволило разработать методы для определения АТФ, лизоцима и тромбина.

Следует особо отметить, что в некоторых работах по определению нуклеиновых кислот предел обнаружения достигал фемто-, а в каких-то случаях и аттомолярных значений. По-видимому, к указанным для EASA столь низким значениям предела обнаружения следует относиться с некоторой долей осторожности, т.к. уже в пионерской работе [74] авторами было отмечено, что экзонуклеаза III проявляет значительную каталитическую активность по отношению к

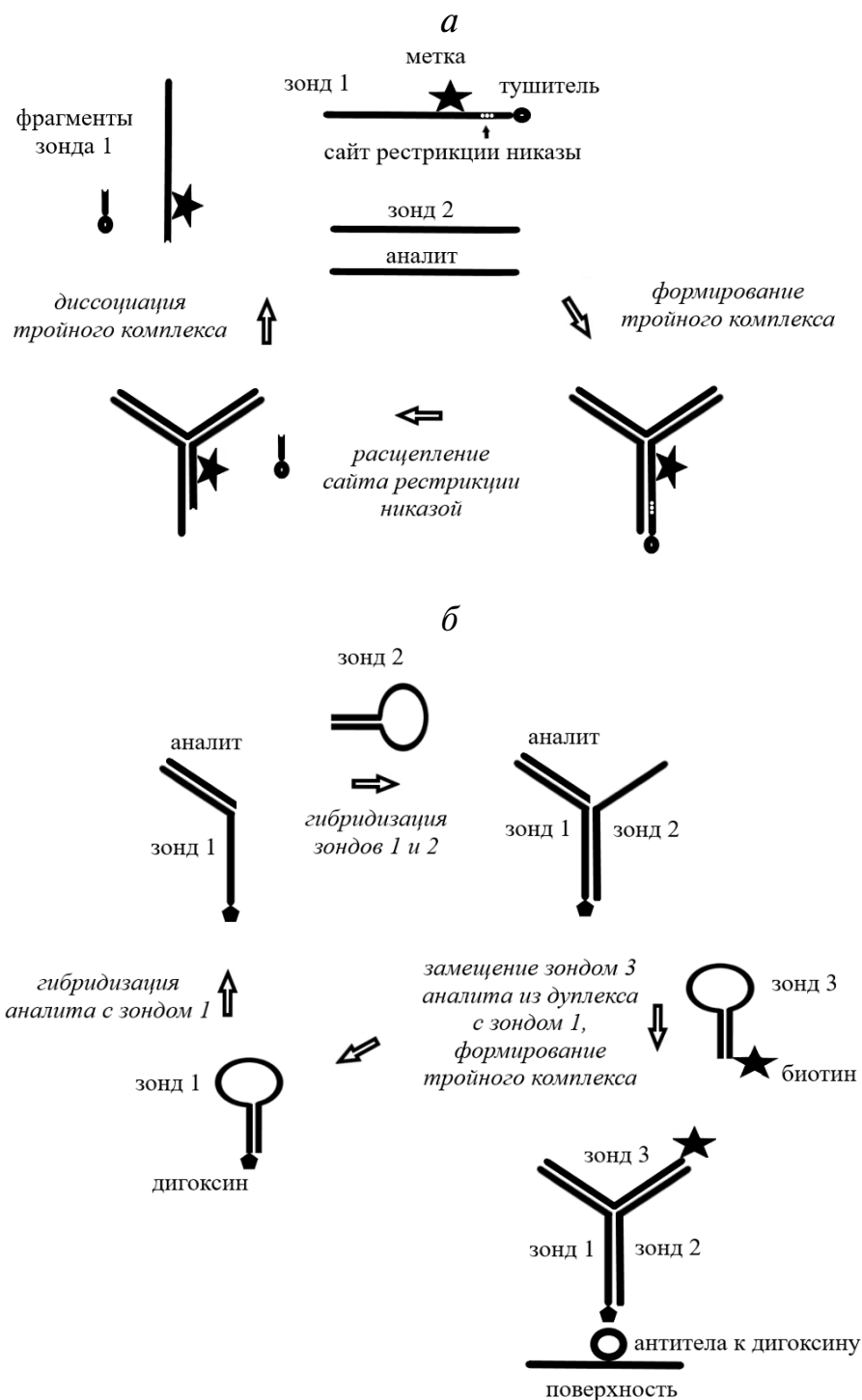


Рис. 4. Схемы методов изотермической амплификации нуклеиновых кислот с формированием Y-структур: а – метод, основанный на формировании и последующем ферментативном расщеплении Y-зонда; б – безферментный метод с применением Y-зонда

одноцепочечным последовательностям ДНК, что должно приводить к ферментативному гидролизу анализируемой последовательности. Наличие этой побочной активности отмечалось и другими авторами [80, 81]. Более того, нами бы-

ло показано, что экзонуклеаза III способна гидролизовать ДНК, имеющую структуру G-квруплекса (неопубликованные данные). Другие экзонуклеазы также катализируют указанные побочные реакции. Отмеченный факт существ-

венно ограничивает развитие метода амплификации с использованием таких экзонуклеаз.

EASA применяется также для повышения чувствительности аналитических методов определения активности ряда ферментов, таких как T4 полинуклеотидкиназа, метилтрансфераза, теломераза [82–84], при этом используются как экзонуклеаза III, так и λ -экзонуклеаза.

Одним из новых изотермических амплификационных методов является **метод с формированием Y-структур** [7]. При формировании таких структур используются два частично комплементарных друг другу зонда (обычно 4–6 п.н.), которые из-за ограниченной комплементарности не связываются друг с другом. В то же время в присутствии анализируемой последовательности, которая частично комплементарна обоим зондам, формируются устойчивые Y-комплексы (рис. 4, а). Более того, фрагмент таких комплексов, образованных при взаимодействии зондов между собой, содержит сайт расщепления рестриктазами. Введение в реакционную среду рестриктазы, соответствующей последовательности сайта расщепления, приводит к ферментативному расщеплению дуплекса с последующей диссоциацией Y-структуры и, соответственно, высвобождением анализируемой последовательности, которая используется для формирования нового Y-зонда. Образующийся Y-зонд принимает участие в следующем цикле амплификации, что в конечном счете приводит к образованию многочисленных гидролизованных фрагментов используемых зондов. Наличие большого числа известных рестриктаз (~3500) позволяет моделировать и получить разнообразия Y-зонды с различными сайтами расщепления. Sintim et al. показали, что архитектура зондов оказывает существенное влияние на скорость ферментативного гидролиза Y-зондов рестриктазами, что необходимо учитывать при моделировании структуры используемых зондов [85]. Следует отметить, что некоторые авторы вместо рестриктаз для гидролиза Y-зонда успешно использовали нуклеазы [86]. Температура проведения этого типа амплификации в различных работах варьируется в диапазоне 25–37 °С.

Как следует из схемы данного анализа (рис. 4, а), метод амплификации с применением Y-зондов может быть использован для определения как ДНК, так и РНК, а также аналитов другой химической природы (например, антибиотиков), при этом в качестве распознающих соединений используются аптамеры [87].

С применением Y-зонда ранее был разработан электрохимический метод определения 28-членного ДНК-олигонуклеотида, являющегося модельным аналитом [88]. В данном методе для

ферментативного расщепления Y-зонда использовалась экзонуклеаза NaeIII. Для регистрации процесса расщепления Y-зонда одна из его последовательностей, иммобилизованная на поверхности электрода, была конъюгирована с метиленовым синим. Данное вещество было пространственно удалено от поверхности электрода и по этой причине электрохимически не окислялось. В результате гидролиза сайта рестрикции Y-зонда данное соединение обрело способность мигрировать к поверхности электрода и там окисляться, что приводило к повышению регистрируемого значения тока, которое было пропорционально концентрации аналита. Предел обнаружения данного метода составил 14 пМ.

Описан также и латеральный проточный метод с колориметрической детекцией для определения микроРНК miR-16 с применением Y-зонда [89]. В данном случае реакцию амплификации проводили в гомогенной среде. Y-Зонд образовывался как результат взаимодействия молекулярного маяка, вспомогательного ДНК-олигонуклеотида и miR-16. В присутствии экзонуклеазы Nt.BbvCI молекулярный маяк в составе полученного Y-зонда расщеплялся на два фрагмента. Это приводило к тому, что вспомогательный олигонуклеотид и miR-16 реагировали со следующей молекулой молекулярного маяка, и процесс повторялся вновь. Концентрацию образовавшихся фрагментов маяка определяли латеральным методом. Предел обнаружения miR-16 составил 0,1 пМ, линейный диапазон – от 0,1 пМ до 10 нМ.

Также был описан модифицированный метод амплификации с применением Y-зондов без использования каких-либо ферментов [90]. На первом этапе молекула аналита за счет комплементарного взаимодействия образует комплекс с двумя шпильками (рис. 4, б), одна из которых содержит присоединенный дигоксин. Надо подчеркнуть, что сами шпильки не способны гибридизоваться между собой в отсутствие аналита. Затем, при добавлении меченной биотином третьей шпильки, которая вытесняет из комплекса молекулу аналита, формируется Y-зонд. Высвободившийся аналит вновь формирует комплекс со шпильками 1 и 2, инициируя начало следующего цикла амплификации, что в результате позволяет без изменения концентрации аналита получить Y-зонд, концентрация которого значительно превышает концентрацию аналита. После проведения реакции амплификации концентрацию образовавшегося Y-зонда, содержащего в своей структуре дигоксин и биотин, определяли электрохимически. Для этого за счет взаимодействия дигоксина с его антителами, сорбированными на поверхности

электрода, проводили иммобилизацию Y-зонда, а последовательное добавление конъюгата стрептавидина с пероксидазой и 3,3',5,5'-тетраметилбензидаина позволило регистрировать величину тока, пропорциональную концентрации Y-зонда. При использовании ДНК-олигонуклеотида в качестве модельного аналита предел обнаружения составил 10,9 аМ, линейный диапазон — от 100 аМ до 1 мкМ.

Никазы применяются не только в методе изотермической амплификации нуклеиновых кислот с формированием Y-зонда, но также и в методе, основанном на применении специфических дуплексов [91]. Схема такого метода представлена на рис. 5. Анализируемая последовательность формирует специфический дуплекс с ДНК-зондом, создавая одновременно сайт рестрикции, распознаваемый одной из никаз. На стадии синтеза в последовательность зонда вводится некая метка, с помощью которой впоследствии проводится оценка выхода ферментативного гидролиза зонда. В дальнейшем специфическая никаза расщепляет последовательность зонда, что приводит к диссоциации дуплекса. Высвобожденная анализируемая молекула взаимодействует со следующей молекулой зонда, и этот процесс повторяется многократно. В результате одна молекула аналита позволяет произвести большое число фрагментов используемого зонда, что, в свою очередь, приводит к повышению регистрируемого сигнала. Температура проведения амплификации должна быть достаточно высокой для быстрой диссоциации расщепленного зонда, но при этом она ограничена термостабильностью используемой никазы. При первом описании данного метода, в котором использовалась никаза Nt.AlwI, температурный оптимум составлял 58 °С [91].

В зависимости от типа вводимой в зонд метки возможно использование различных методов регистрации сигнала. Так, в работе Lin et al. [92] ДНК-зонд представлял из себя шпильку, при этом одна из цепей стебля шпильки была аптамером гемина. После реакции зонда с анализируемой последовательностью (19-членным олигонуклеотидом гена *p53*) формировался дуплекс с сайтом рестрикции никазы Nt.BstNBI. После ферментативного гидролиза высвобождался аптамер гемина, и после добавления в реакционную среду гемина происходило формирование каталитически активного пероксидаза-подобного ДНКзима, активность которого определялась при окислении 2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфоната) в присутствии пероксида водорода. Одновременно происходило высвобождение аналита из дуплекса, что позволяло ему вступать во взаимодействие со следую-

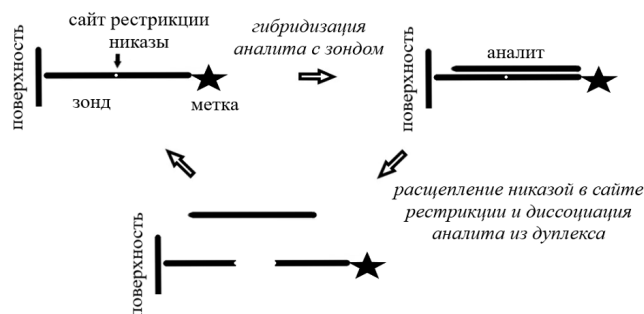


Рис. 5. Схема метода с применением никазы, основанного на формировании и последующем ферментативном расщеплении ДНК-дуплекса

щей молекулой зонда. Для данного метода предел обнаружения фрагмента гена *p53* составил 1 пМ, рабочий диапазон — 1–100 пМ.

Данный метод амплификации был применен также в комбинации с электрохимическим методом детекции нуклеиновых кислот. Chen et al. [93] описали приготовление ДНК-зонда-шпильки с ковалентно связанным ферроценом, который был иммобилизован на поверхность золотого электрода. После ферментативного расщепления сайта рестрикции, образованного при его взаимодействии с аналитом, фрагменты зонда, модифицированные ферроценом, отдалялись от поверхности электрода. Предел обнаружения модельного ДНК-аналита, измеренный с помощью электрохимического биосенсора, составил 68 аМ, а линейный диапазон — от 0,1 до 100 фМ.

Недавно была опубликована работа, в которой метод амплификации с использованием никазы Nt. AlwI применили в количественном анализе катионов ртути [94]. Используя образование комплекса тимин– Hg^{2+} –тимин как индикаторную реакцию, Vijayan et al. разработали метод анализа с пределом обнаружения 0,14 нМ. Авторы показали, что разработанный метод может применяться для определения ртути в питьевой воде. На основе амплификации с помощью никазы также были успешно разработаны методы с использованием аптамеров для определения лизоцима, карциноэмбрионального и простатспецифического антигенов, а также муцина-16 в сыворотке крови человека [95].

В работах с применением данного типа амплификации отмечается высокая специфичность разрабатываемых методов анализа. Тем более странно, что число публикаций с упоминанием о применении данного метода амплификации значительно меньше, чем в случае других изотермических амплификационных методов.

В 2009 г. был описан изотермический амплификационный метод с полимеризацией и замещением (ICSDP) [96]. Принцип метода представ-

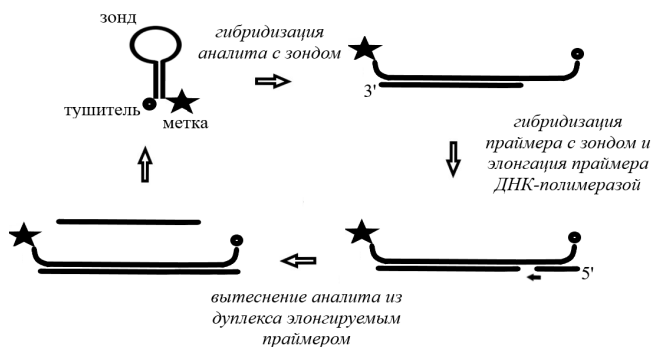


Рис. 6. Схема метода с использованием амплификации с полимеризацией и замещением (ICS DP)

лен на рис. 6. Этот метод основан на применении ДНК-шпильки (зонда), короткого праймера и ДНК-полимеразы. Структура зонда включает в себя некую метку, позволяющую оценивать концентрацию данной молекулы. Поскольку последовательность, расположенная на 5'-конце и формирующая стебель зонда и часть его петли, комплементарна анализируемой последовательности, это позволяет им специфически взаимодействовать друг с другом с образованием дуплекса и раскрытием структуры шпильки. Праймер, обычно представляющий собой последовательность длиной в восемь нуклеотидов, комплементарен 3'-концу стебля зонда. При отсутствии анализа праймер с зондом не взаимодействует, тогда как в присутствии молекулы анализа после образования дуплекса праймер связывается с освобожденным 3'-концом зонда.

Связывание праймера инициирует реакцию его элонгации в присутствии ДНК-полимеразы и дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфатов. В процессе удлинения праймера синтезируемая последовательность вытесняет анализ, переводя его в несвязанное состояние. Это, в свою очередь, позволяет ему гибридизоваться с другой молекулой зонда-шпильки, что запускает следующий цикл полимеризации/вытеснения. Следовательно, молекула анализа выступает в качестве триггера реакции полимеризации. Параллельно с расхождением зонда происходит накопление дуплекса, состоящего из зонда и синтезированной последовательности, концентрация которого может быть измерена различными физико-химическими методами. Таким образом, изотермический ICS DP, который проводится обычно при 37 °С, позволяет амплифицировать сигнал при постоянной концентрации анализа.

Guo et al. [96] в качестве зонда использовали молекулярный маяк, у которого на концах шпильки находились флуоресцеин как флуоресцентная метка и DABCYL как тушитель флуоресценции. Реакция полимеризации катализи-

ровалась фрагментом Кленова. Для определения модельного 26-членного ДНК-олигонуклеотида был развит флуоресцентный гомогенный метод с ICS DP, предел обнаружения которого составил 6,4 фМ.

Аналогичный принцип был использован при разработке метода определения микроРНК miR-210 [97]. Предел обнаружения описанного метода составил 50 пМ. Следует отметить, что линейный диапазон определения микроРНК для данного метода оказался достаточно узким (от 330 пМ до 1,66 нМ). С помощью разработанного метода был проведен анализ miR-210 в трансфицированных клетках K562.

ICS DP был также использован при разработке гетерогенных методов определения нуклеиновых кислот. Так, Gao et al. [98] на поверхности золотого электрода иммобилизовали шпильку, модифицированную ферроценом. В присутствии анализа происходило ее раскрытие и высвобождение комплементарного праймеру фрагмента, модифицированного метиленовым голубым. После гибридизации праймера происходила его элонгация в присутствии ДНК-полимеразы со способностью к замещению цепи. Предел обнаружения электрохимического биосенсора, разработанного для определения модельного ДНК-аналита (31 нуклеотид), составил 28 фМ. Рабочий диапазон метода находился в диапазоне от 100 фМ до 10 нМ. Аналогичный подход был применен для определения гена *mecA* в метициллин-резистентных штаммах *Staphylococcus aureus* [99].

Следует отметить, что поскольку в ICS DP используется ДНК-полимераза, данный метод может быть чувствителен к компонентам, ингибирующим ДНК-полимеразу, что может приводить к получению ложноотрицательных результатов. К тому же фоновая амплификация, вызванная неспецифической гибридизацией, в свою очередь, может приводить к ложноположительным результатам.

В отличие от описанных выше изотермических методов амплификации нуклеиновых кислот, в **реакции цепной гибридизации** (HCR) не используются какие-либо ферменты. Данный метод был разработан Дирксом и Пирсом в 2004 г. [100]. В основе метода HCR лежит реакция образования двухцепочечной ДНК в результате взаимодействия двух шпилек, которая инициируется ДНК/РНК-аналитом (рис. 7). Следует отметить, что структура шпилек 1 и 2 выбирается таким образом, чтобы их комплементарные взаимодействия между собой были кинетически затруднены. В присутствии анализа образование дуплекса между шпилькой 1 и анализируемой последовательностью приводит к высво-

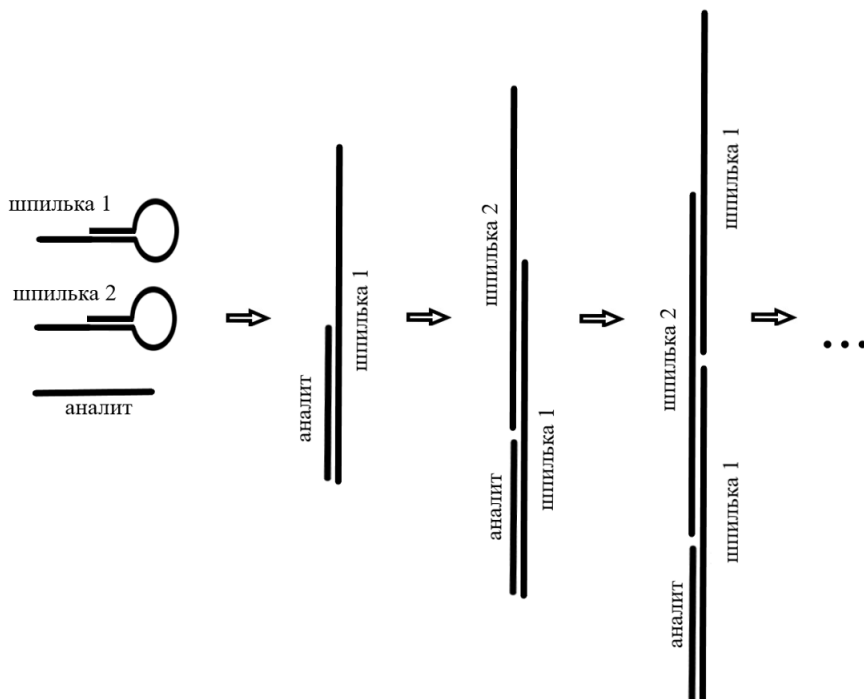


Рис. 7. Схема безферментного изотермического метода амплификации с применением реакции цепной гибридизации (HCR)

бождению не вступающей в это взаимодействие последовательности стебля шпильки 1, что, в свою очередь, позволяет этому одноцепочечному фрагменту вступить в реакцию со шпилькой 2. Последняя реакция приводит к образованию дуплекса между используемыми шпильками и одновременному высвобождению непрореагировавшей последовательности стебля шпильки 2, которая затем вступает в реакцию с другой молекулой шпильки 1. Введение детектирующих меток в структуру шпилек или интеркалирование красителей в структуру дуплекса позволяет зарегистрировать образующуюся ДНК. Таким образом, в результате проведения HCR формируется двухцепочечная ДНК с разрывами в каждой цепи, при этом длина молекулы определяется количеством шпилек в реакционном растворе. Обычно амплификация проводится при 25 или 37 °С.

Для усиления эффекта амплификации были разработаны методы с использованием шпильки с двумя и большим количеством петель, что позволяло получать разветвленную структуру двухцепочечной ДНК [101]. С использованием четырех шпилек и двух дополнительных одноцепочечных ДНК описана модификация метода HCR, названная гиперразветвленной HCR (hyperbranched HCR). Кинетика амплификации данной модификации экспоненциальная, а продуктом амплификации является разветвлен-

ная двухцепочечная ДНК [102]. Таким образом, в случае HCR анализ может инициировать формирование дуплексов ДНК с наличием разрывов в обеих цепях, и увеличение интенсивности аналитического сигнала происходит из-за того, что сформировавшаяся ДНК содержит в своей структуре большое число введенных меток.

При использовании HCR в биоанализе часто применяются шпильки (одна или две), содержащие биотин. Так, в работе Yang et al. [103] исследуемая ДНК (модельный анализ) инициировала проведение HCR с формированием дуплексной цепочки, содержащей биотин, т.к. одна из исходных шпилек была модифицирована данным соединением. За счет присутствия в дуплексе биотиновых остатков он способен взаимодействовать со стрептавидином, сорбированным на магнитных частицах. Поскольку не все биотины дуплекса были задействованы в процессе иммобилизации на частицах, другая часть остатков биотина была использована для взаимодействия с конъюгатом авидина и глюкозооксидазы. В присутствии глюкозооксидазы глюкоза окислялась, что приводило к образованию пероксида водорода. В его присутствии происходило травление поверхности наночастиц серебра, что регистрировалось методом поверхностного плазмонного резонанса. Предел обнаружения анализа в этом случае составил 6 фМ, линейный диапазон – от 10 фМ до 100 пМ.

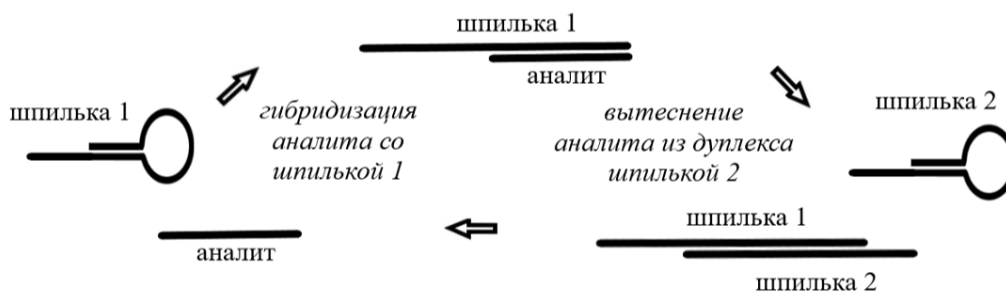


Рис. 8. Схема безферментного изотермического метода амплификации с применением метода каталитической сборки шпилек (СНА)

НСР была применена при конструировании электрохимического биосенсора, предназначенного для определения микроРНК в лизате клеток HUVES, НК-2, HeLa и MCF-7 [104]. Достигнутый с помощью вольтамперметрической детекции предел обнаружения микроРНК Hsa-miR-17-5p составил 2 аМ, линейный диапазон – от 100 аМ до 100 пМ.

Более того, было показано, что НСР может быть эффективна как метод для внутриклеточной визуализации РНК. Так, в работе Wu et al. [105] описан флуоресцентный метод для оценки экспрессии мРНК в пикомолярном интервале концентраций. Следует также отметить, что использование данного метода не требует применения реакции обратной транскрипции.

Помимо анализа нуклеиновых кислот, описано применение метода НСР в анализе ионов ртути, АТФ, а также белков. Guo et al. [106] в качестве модельных белковых биомаркеров использовали α -фетопротеин и простат-специфический антиген. В присутствии аналитов на поверхности электрода происходило формирование иммунных комплексов. Вторичные антитела были ковалентно связаны с ДНК-олигонуклеотидом, запускающим НСР. Предел обнаружения, полученный при вольтамперметрической детекции, для α -фетопротеина составил 0,25 пг/мл, для простат-специфического антигена – 0,17 пг/мл.

С помощью НСР успешно проводилась идентификация опухолевых клеток [107]. Методы данного направления основаны на специфическом взаимодействии аптамеров с маркерами, расположенными на поверхности исследуемых клеток.

Как и НСР, метод каталитической сборки шпилек (СНА) не требует применения каких-либо ферментов. Как видно на рис. 8, в основе СНА лежит использование двух олигонуклеотид-шпилек [108]. За счет комплементарности первая шпилька может взаимодействовать с аналитом, что приводит к образованию дуплек-

са. При этом домен шпилек 1, комплементарный последовательности хвоста шпилек 2, становится доступен для такого взаимодействия. Следует отметить, что структура используемых шпилек-зондов моделируется с учетом того, что они должны быть комплементарны друг другу, но их взаимодействие между собой должно быть кинетически затруднено.

Доступность освобожденного домена приводит к осуществлению его реакции со шпилькой 2. Такая реакция сопровождается вытеснением аналита из первичного дуплекса, что инициирует начало следующего цикла амплификации. Таким образом, одна молекула аналита способна инициировать образование большого числа дуплексов. При использовании СНА чрезвычайно важно уделять серьезное внимание предотвращению взаимодействия шпилек между собой в отсутствие аналита, т.к. протекание такой реакции будет повышать фоновый сигнал анализа и тем самым понижать его чувствительность. Таким образом, в отличие от НСР, которая, как и СНА, протекает без использования какого-либо фермента, в случае СНА повышение интенсивности аналитического сигнала происходит из-за того, что молекула аналита многократно участвует в проведении индикаторной реакции.

На сегодняшний день большая часть исследований с использованием СНА нацелена на разработку методов анализа микроРНК, которые считаются перспективными биомаркерами для диагностики онкологических заболеваний [109]. Продукты СНА могут быть зарегистрированы различными физико-химическими методами. Так, в работе Zhang et al. [110] для детекции микроРНК miR-21 с применением СНА использовали электрофорез. Для данного метода предел обнаружения микроРНК составил 10 пМ. Электрохимический метод анализа с применением СНА использован в работе Shuai et al. [111], в которой шпилька 1 была иммобилизована на поверхности электрода, а шпилька 2

была модифицирована биотином/конъюгатом щелочной фосфатазы со стрептавидином. Предел детекции miR-21 составил 50 аМ, линейный диапазон — от 0,1 фМ до 100 пМ.

Флуоресцентный гомогенный метод определения микроРНК miR-let-7a с применением молекулярного маяка и СНА для амплификации регистрируемого сигнала был описан в работе Jiang et al. [112]. Данный метод позволил определить анализируемую микроРНК с концентрацией, равной 1 пМ. Линейный диапазон метода находился в интервале от 1 пМ до 2 нМ.

Следует заметить, что некоторые авторы, стремясь дополнительно повысить чувствительность аналитических методов, используют не один метод, а комбинацию двух разных амплификационных методов. Данные комбинации получили название каскадных методов амплификации [24]. Так, в работах Dong et al. [113] и Xu et al. [114] были объединены, соответственно, СНА и RCA с методом амплификации с использованием никазы. Сочетание RCA и EASA было использовано для идентификации ДНК генетически модифицированной сои MON89788. Предел обнаружения этого метода составил 45 аМ [115]. Для повышения чувствительности анализа RCA использовалось также его сопряжение с СНА [116]. Однако предел обнаружения в этом случае был достаточно высок (100 фМ).

Флуоресцентный биосенсор был разработан для определения бисфенола А с использованием сочетания метода с формированием Y-структур и EASA [117]. Предел обнаружения бисфенола А составил 5 фМ, линейный диапазон — от 10 фМ до 10 нМ. Метод определения аденозина с применением HCR и EASA был опубликован Sun et al. [118]. В некоторых случаях применялся другой подход, когда один и тот же метод использовался несколько раз для амплификации различных промежуточных соединений [119].

Таким образом, в данном обзоре представлены данные по изотермическим методам амплификации нуклеиновых кислот, которые были разработаны как альтернатива ПЦР. В настоящее время эти методы активно и успешно применяются в биоанализе для повышения детектируемости и чувствительности количественного определения анализируемых соединений — как нуклеиновых кислот, так и веществ другой химической природы (белков, ферментов, антибиотиков, наркотиков и т.д.), определение которых построено на применении ДНК/РНК-аптамеров. Большинство методов с использованием изотермической амплификации нуклеиновых кислот обладают высокой чувствительностью.

Благодаря этому многие аналиты могут определяться в фемто- и пикомолярных концентрациях. Описаны также методы, позволяющие детектировать исследуемые вещества в аттомолярных концентрациях. Такая чувствительность методов позволяет детектировать практически все значимые аналиты в реальных образцах.

В то же время существует достаточное количество вопросов, которые должны быть разрешены в будущем. В первую очередь это касается ложноположительных и ложноотрицательных сигналов, получаемых в некоторых случаях при работе с реальными образцами. Другой важный вопрос, ожидающий своего разрешения, заключается в том, что исследователи из различных научных групп, используя идентичные методы амплификации и детекции, разрабатывают методы количественного определения аналитов с пределами обнаружения, которые часто отличаются между собой на несколько порядков. Причины таких расхождений должны быть обязательно выяснены в ближайшее время. Следует отметить, что многие описанные методы с низкими значениями предела обнаружения имеют невысокую чувствительность, что не позволяет их использовать для определения аналитов, концентрация которых при патологии не сильно отличается от их концентрации в норме, например, микроРНК miR-21 [120]. Нужно также заметить, что количество опубликованных работ по применению аналитических методов, сопряженных с методами амплификации, для количественного определения биомаркеров аналитов в реальных образцах невысоко, а большинство работ проводилось по их определению лишь в буферных растворах. Все вышеперечисленное указывает на необходимость продолжения интенсивных научных исследований по оценке применимости в биоанализе и усовершенствованию изотермических методов амплификации, а также разработке на их основе высокочувствительных и высокоселективных методов анализа с высокой точностью измерений, которые так необходимы для практического применения.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант 17-14-01042).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Manzanares-Palenzuela, C.L., de-los-Santos-Alvarez, N., Lobo-Castanon, M.J., and Lopez-Ruiz, B. (2015) Multiplex electrochemical DNA platform for femtomolar-level quantification of genetically modified soybean, *Biosens. Bioelectron.*, **68**, 259–265, doi: 10.1016/j.bios.2015.01.007.
- Cavanaugh, S.E., and Bathrick, A.S. (2018) Direct PCR amplification of forensic touch and other challenging DNA samples: a review, *Foressic Sci. Int. Genet.*, **32**, 40–49, doi: 10.1016/j.fsigen.2017.10.005.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., and Griffith, R. (1992) Simultaneous amplification and detection of specific DNA-sequences, *Biotechnology (NY)*, **10**, 413–417.
- Алексеев Я.И., Белов Ю.В., Варламов Д.А., Коновалов С.В., Курочкин В.Е., Маракушин Н.Ф., Петров А.И., Петряков А.О., Румянцев Д.А., Скоблilов Е.Ю., Соколов В.Н., Фесенко В.А., Чернышев А.В. (2006) Приборы для диагностики биологических объектов на основе метода полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ), *Научное приборостроение*, **16**, 132–136.
- Borst, A., Vox, A.T.A., and Fluit, A.C. (2004) False-positive results and contamination in nucleic acid amplification assays: suggestions for a prevent and destroy strategy, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **23**, 289–299, doi: 10.1007/s10096-004-1100-1.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., and Hase, T. (2000) Loop-mediated isothermal amplification of DNA, *Nucleic Acids Res.*, **28**, E63, doi: 10.1093/nar/28.12.e63.
- Yan, L., Zhou, J., Zheng, Y., Gamson, A.S., Roembke, B.T., Nakayama, S., and Sintim, H.O. (2014) Isothermal amplified detection of DNA and RNA, *Mol. Biosyst.*, **10**, 970–1003, doi: 10.1039/c3mb70304e.
- Mori, Y., Kitao, M., Tomita, N., and Notomi, T. (2004) Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA, *J. Biochem. Biophys. Methods*, **59**, 145–157, doi: 10.1016/j.jbbm.2003.12.005.
- Tomita, N., Mori, Y., Kanda, H., and Notomi, T. (2008) Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products, *Nat. Protoc.*, **3**, 877–882, doi: 10.1038/nprot.2008.57.
- Pang, B., Yao, S., Xu, K., Wang, J., Song, X.L., Mu, Y., Zhao, C., and Li, J. (2019) A novel visual-mixed-dye for LAMP and its application in the detection of foodborne pathogens, *Anal. Biochem.*, **574**, 1–6, doi: 10.1016/j.ab.2019.03.002.
- Troger, V., Niemann, K., Gartig, C., and Kuhlmeier, D. (2015) Isothermal amplification and quantification of nucleic acids and its use in microsystems, *J. Nanomed. Nanotechnol.*, **6**, 282–298, doi: 10.4172/2157-7439.1000282.
- Najian, A.B.N., Foo, P.C., Ismail, N., Kim-Fatt, L., and Yean, C.Y. (2019) Probe-specific loop-mediated isothermal amplification magnetosensor assay for rapid and specific detection of pathogenic *Leptospira*, *Mol. Cell. Probes*, **44**, 63–68, doi: 10.1016/j.mcp.2019.03.001.
- Shchit, I.Yu., Ignatov, K.B., Kudryavtseva, T.Yu., Shishkova, N.A., Mironova, R.I., Marinin, L.I., Mokrievich, A.N., Kramarov, V.M., Biketov, S.F., and Dyatlov, I.A. (2017) The use of loop-mediated isothermal DNA amplification for the detection and identification of the anthrax pathogen, *Mol. Genet. Microbiol. Virol.*, **32**, 100–108, doi: 10.3103/S0891416817020094.
- Poschl, B., Waneesorn, J., Thekisoe, O., Chutipongvivate, S., and Panagiotis, K. (2010) Comparative diagnosis of malaria infections by microscopy, nested PCR, and LAMP in northern Thailand, *Am. J. Tropical Med. Hygiene*, **83**, 56–60, doi: 10.4269/ajtmh.2010.09-0630.
- Gao, X., Sun, B., and Guan, Y. (2019) Pullulan reduces the non-specific amplification of loop-mediated isothermal amplification (LAMP), *Anal. Bioanal. Chem.*, **411**, 1211–1218, doi: 10.1007/s00216-018-1552-2.
- Yang, Q., Domesle, K.J., and Ge, B. (2018) Loop-mediated isothermal amplification for Salmonella detection in food and feed: current applications and future directions, *Foodborne Pathogens and Disease*, **15**, 309–331, doi: 10.1089/fpd.2018.2445.
- Maruyama, F., Kenzaka, T., Yamaguchi, N., Tani, K., and Nasu, M. (2003) Detection of bacteria carrying the *stx*₂ gene by *in situ* loop-mediated isothermal amplification, *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 5023–5028, doi: 10.1128/aem.69.8.5023-5028.2003.
- Щит И.Ю., Игнатов К.Б., Бикетов С.Ф. (2018) Сравнительный анализ методов ЛАМР и ПЦР-РВ для обнаружения возбудителей сапа и мелиоидоза, *Клинич. лаб. диагностика*, **63**.
- Макарова Ю.А., Зотиков А.А., Белякова Г.А., Алексеев Б.Я., Шкурников М.Ю. (2018) Изотермическая петлевая амплификация: эффективный метод экспресс-диагностики в онкологии, *Онкоурология*, **14**, 88–99, doi: 10.17650/1726-9776-2018-14-2-88-99.
- Wong, Y.P., Othman, S., Lau, Y.L., Radu, S., and Chee, H.Y. (2018) Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of microorganisms, *J. Appl. Microbiol.*, **124**, 626–643, doi: 10.1111/jam.13647.
- Compton, J. (1991) Nucleic acid sequence-based amplification, *Nature*, **350**, 91–92, doi: 10.1038/350091a0.
- Kievits, T., van Gemen, B., van Strijp, D., Schukink, R., Dircks, M., Adriaanse, H., Malek, L., Sooknanan, R., and Lens, P. (1991) NASBA isothermal enzymatic *in vitro* nucleic acid amplification optimized for the diagnosis of HIV-1 infection, *J. Virol. Methods*, **35**, 273–286.
- Mader, A., Riehle, U., Brandstetter, T., Stickeler, E., and Ruehe, J. (2012) Universal nucleic acid sequence-based amplification for simultaneous amplification of messengerRNAs and microRNAs, *Anal. Chim. Acta*, **754**, 1–7, doi: 10.1016/j.aca.2012.09.045.
- Ma, Y., Dai, X., Hong, T., Munk, G.B., and Libera, M. (2017) A NASBA on microgel-tethered molecular-beacon microarray for real-time microbial molecular diagnostics, *Analyst*, **142**, 147–155, doi: 10.1039/c6an02192a.
- Lu, X., Shi, X., Wu, G., Wu, T., Qin, R., and Wang, Y. (2017) Visual detection and differentiation of Classic Swine Fever Virus strains using nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) and G-quadruplex DNzyme assay, *Scientific Reports*, **7**, 44211, doi: 10.1038/srep44211.
- Zeng, W., Yao, W., Wang, Y., Li, Y., Bermann, S.M., Ren, Y., Shi, C., Song, X., Huang, Q., Zheng, S., and Wang, Q. (2017) Molecular detection of genotype II grass carp reovirus based on nucleic acid sequence-based amplification combined with enzyme-linked immunosorbent assay (NASBA-ELISA), *J. Virol. Methods*, **243**, 92–97, doi: 10.1016/j.jviromet.2017.02.001.
- Honsvall, B.K., and Robertson, L.J. (2017) From research lab to standard environmental analysis tool: will NASBA make the leap? *Water Res.*, **109**, 389–397, doi: 10.1016/j.watres.2016.11.052.
- Vincent, M., Xu, Y., and Kong, H. (2004) Helicase-dependent isothermal DNA amplification, *EMBO Reports*, **5**, 795–800, doi: 10.1038/sj.embor.7400200.
- Zhao, Y., Chen, F., Li, Q., Wang, L., and Fan, C. (2015) Isothermal amplification of nucleic acids, *Chem. Rev.*, **115**, 12491–12545, doi: 10.1021/acs.chemrev.5b00428.

28. Barreda-Garcia, S., Miranda-Castro, R., de-los-Santos-Alvarez, N., Miranda-Ordieres, A.J., and Lobo-Castanon, M.J. (2018) Helicase-dependent isothermal amplification: a novel tool in the development of molecular-based analytical systems for rapid pathogen detection, *Anal. Bioanal. Chem.*, **410**, 679–693, doi: 10.1007/s00216-017-0620-3.
29. Mahalanabis, M., Do, J., ALMuayad, H., Zhang, J.Y., and Klapperich, C.M. (2011) An integrated disposable device for DNA extraction and helicase dependent amplification, *Biomed. Microdevices*, **13**, 353–359, doi: 10.1007/s10544-009-9391-8.
30. Ao, W., Aldous, S., Woodruff, E., Hicke, B., Rea, L., Kreiswirth, B., and Jenison, R. (2012) Rapid detection of *rpoB* gene mutations conferring rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, *J. Clin. Microbiol.*, **50**, 2433–2440, doi: 10.1128/JCM.00208-12.
31. Tang, R., Yang, H., Gong, Y., You, M., Liu, Z., Choi, J.R., Wen, T., Qu, Z., Mei, Q., and Xu, F. (2017) A fully disposable and integrated paper-based device for nucleic acid extraction, amplification and detection, *Lab on a Chip*, **17**, 1270–1279, doi: 10.1039/c6lc01586g.
32. Barreda-Garcia, S., Miranda-Castro, R., de-Los-Santos-Alvarez, N., Miranda-Ordieres, A.J., and Lobo-Castanon, M.J. (2017) Solid-phase helicase dependent amplification and electrochemical detection of *Salmonella* on highly stable oligonucleotide-modified ITO electrodes, *Chem. Commun.*, **53**, 9721–9724, doi: 10.1039/c7cc05128j.
33. Schwenkbier, L., Pollok, S., Rudloff, A., Sailer, S., Cialla-May, D., Weber, K., and Popp, J. (2015) Non-instrumented DNA isolation, amplification and microarray-based hybridization for a rapid on-site detection of devastating *Phytophthora kernoviae*, *Analyst*, **140**, 6610–6618, doi: 10.1039/c5an00855g.
34. Toldra, A., Jauset-Rubio, M., Andree, K.B., Fernandez-Tejedor, M., Diogene, J., Katakis, I., O'Sullivan, C.K., and Campas, M. (2018) Detection and quantification of the toxic marine microalgae *Karlodinium veneficum* and *Karlodinium armiger* using recombinase polymerase amplification and enzyme-linked oligonucleotide assay, *Anal. Chim. Acta*, **1039**, 140–148, doi: 10.1016/j.aca.2018.07.057.
35. Ma, F., Liu, M., Tang, B., and Zhang, C.Y. (2017) Sensitive quantification of microRNAs by isothermal helicase-dependent amplification, *Anal. Chem.*, **89**, 6183–6188, doi: 10.1021/acs.analchem.7b01113.
36. Reid, M.S., Le, X.C., and Zhang, H. (2018) Exponential isothermal amplification of nucleic acids and assays for proteins, cells, small molecules, and enzyme activities: an EXPAR example, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **57**, 11856–11866, doi: 10.1002/anie.201712217.
37. Van Ness, J., Van Ness, L.K., and Galas, D.J. (2003) Isothermal reactions for the amplification of oligonucleotides, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 4504–4509, doi: 10.1073/pnas.0730811100.
38. Wang, H., Wang, H., Duan, X., Wang, X., Sun, Y., and Li, Z. (2017) Sensitive detection of mRNA by using specific cleavage-mediated isothermal exponential amplification reaction, *Sens. Actuat. B: Chemical*, **252**, 215–221, doi: 10.1016/j.snb.2017.06.008.
39. Li, R.D., Yin, B.C., and Ye, B.C. (2016) Ultrasensitive, colorimetric detection of microRNAs based on isothermal exponential amplification reaction-assisted gold nanoparticle amplification, *Biosens. Bioelectron.*, **15**, 1011–1016, doi: 10.1016/j.bios.2016.07.042.
40. Liu, H., Zhang, L., Xu, Y., Chen, J., Wang, Y., Huang, Q., Che, X., Liu, Y., Da, Z., Zou, X., and Li, Z. (2019) Sandwich immunoassay coupled with isothermal exponential amplification reaction: an ultrasensitive approach for determination of tumor marker MUC1, *Talanta*, **204**, 248–254, doi: 10.1016/j.talanta.2019.06.001.
41. Jia, H., Wang, Z., Wang, C., Chang, L., and Li, Z. (2014) Real-time fluorescence detection of Hg²⁺ ions with high sensitivity by exponentially isothermal oligonucleotide amplification, *RSC Adv.*, **4**, 9439–9444, doi: 10.1039/C3RA45986A.
42. Tian, L., and Weizmann, Y. (2013) Real-time detection of telomerase activity using the exponential isothermal amplification of telomere repeat assay, *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 1661–1664, doi: 10.1021/ja309198j.
43. Wang, L., Ren, M., Zhang, Q., Tang, B., and Zhang, C. (2017) Excision repair-initiated enzyme-assisted bicyclic cascade signal amplification for ultrasensitive detection of uracil-DNA glycosylase, *Anal. Chem.*, **89**, 4488–4494, doi: 10.1021/acs.analchem.6b04673.
44. Walker, G.T., Fraiser, M.S., Schram, J.L., Little, M.C., Nadeau, J.G., and Malinowski, D.P. (1992) Strand displacement amplification – an isothermal, *in vitro* DNA amplification technique, *Nucleic Acids Res.*, **20**, 1691–1696, doi: 10.1093/nar/20.7.1691.
45. Shi, C., Ge, Y., Gu, H., and Ma, C. (2011) Highly sensitive chemiluminescent point mutation detection by circular strand-displacement amplification reaction, *Biosens. Bioelectron.*, **26**, 4697–4701, doi: 10.1016/j.bios.2011.05.017.
46. Zhao, Y., Zhou, L., and Tang, Z. (2013) Cleavage-based signal amplification of RNA, *Nat. Commun.*, **4**, 1493, doi: 10.1038/ncomms2492.
47. Shi, C., Liu, Q., Ma, C., and Zhong, W. (2014) Exponential strand-displacement amplification for detection of microRNAs, *Anal. Chem.*, **86**, 336–339, doi: 10.1021/ac4038043.
48. Ren, R., Leng, C., and Zhang, S. (2010) Detection of DNA and indirect detection of tumor cells based on circular strand-replacement DNA polymerization on electrode, *Chem. Commun.*, **46**, 5758–5760, doi: 10.1039/C002466J.
49. Ding, C., Li, X., Ge, Y., and Zhang, S. (2010) Fluorescence detection of telomerase activity in cancer cells based on isothermal circular strand-displacement polymerization reaction, *Anal. Chem.*, **82**, 2850–2855, doi: 10.1021/ac902818w.
50. Zhu, C., Wen, Y., Li, D., Wang, L., Song, S., Fan, C., and Willner, I. (2009) Inhibition of the *in vitro* replication of DNA by an aptamer-protein complex in an autonomous DNA machine, *Chemistry*, **15**, 11898–11903, doi: 10.1002/chem.200901275.
51. Li, Y., Zeng, Y., Mao, Y., Lei, C., and Zhang, S. (2014) Proximity-dependent isothermal cycle amplification for small-molecule detection based on surface enhanced Raman scattering, *Biosens. Bioelectron.*, **51**, 304–309, doi: 10.3390/bios9020057.
52. Li, J., Macdonald, J., and von Stetten, F. (2019) Review: a comprehensive summary of a decade development of the recombinase polymerase amplification, *Analyst*, **144**, 31–67, doi: 10.1039/c8an01621f.
53. Kersting, S., Rausch, V., Bier, F.F., and von Nickisch-Rosenegk, M. (2014) Rapid detection of *Plasmodium falciparum* with isothermal recombinase polymerase amplification and lateral flow analysis, *Malar. J.*, **13**, 99, doi: 10.1186/1475-2875-13-99.
54. Lobato, I.M., and O'Sullivan, C.K. (2018) Recombinase polymerase amplification: basics, applications and recent advances, *Trends Anal. Chem.*, **98**, 19–35, doi: 10.1016/j.trac.2017.10.015.
55. Mayboroda, O., Gonzalez Benito, A., Sabate del Rio, J., Svobodova, M., Julich, S., Tomaso, H., O'Sullivan, C.K., and Katakis, I. (2016) Isothermal solid-phase amplification system for detection of *Yersinia pestis*, *Anal. Bioanal. Chem.*, **408**, 671–676, doi: 10.1007/s00216-015-9177-1.
56. Ng, B.Y., Xiao, W., West, N.P., Wee, E.J., Wang, Y., and Trau, M. (2015) Rapid, single-cell electrochemical detec-

- tion of *Mycobacterium tuberculosis* using colloidal gold nanoparticles, *Anal. Chem.*, **87**, 10613–10618, doi: 10.1021/acs.analchem.5b03121.
57. Tsaloglou, M.N., Nemiroski, A., Camci-Unal, G., Christodouleas, D.C., Murray, L.P., Connelly, J.T., and Whitesides, G.M. (2017) Handheld isothermal amplification and electrochemical detection of DNA in resource-limited settings, *Anal. Biochem.*, **543**, 116–121, doi: 10.1016/j.ab.2017.11.025.
 58. Yang, B., Kong, J., and Fang, X. (2019) Bandage-like wearable flexible microfluidic recombinase polymerase amplification sensor for the rapid visual detection of nucleic acids, *Talanta*, **204**, 685–692, doi: 10.1016/j.talanta.2019.06.031.
 59. Fire, A., and Xu, S.Q. (1995) Rolling replication of short DNA circles, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **92**, 4641–4645, doi: 10.1073/pnas.92.10.4641.
 60. Goo, N.-I., and Kim, D.-E. (2016) Rolling circle amplification as isothermal gene amplification in molecular diagnostics, *BioChip J.*, **10**, 262–271, doi: 10.1007/s13206-016-0402-6.
 61. Nilsson, M., Barbany, G., Antson, D.O., Gertow, K., and Landegren, U. (2000) Enhanced detection and distinction of RNA by enzymatic probe ligation, *Nat. Biotechnol.*, **18**, 791–793, doi: 10.1038/77367.
 62. Marciniak, J., Kummel, A.C., Esener, S.C., Heller, M.J., and Messmer, B.T. (2008) Coupled rolling circle amplification loop-mediated amplification for rapid detection of short DNA sequences, *Biotechniques*, **45**, 275–280, doi: 10.2144/000112910.
 63. Li, X.H., Zhang, X.L., Wu, J., Lin, N., Sun, W.M., Chen, M., Ou, Q.S., and Lin, Z.Y. (2019) Hyperbranched rolling circle amplification (HRCAs)-based fluorescence biosensor for ultrasensitive and specific detection of single-nucleotide polymorphism genotyping associated with the therapy of chronic hepatitis B virus infection, *Talanta*, **191**, 277–282, doi: 10.1016/j.talanta.2018.08.064.
 64. Schopf, E., Liu, Y., Deng, J.C., Yang, S., Cheng, G., and Chen, Y. (2011) *Mycobacterium tuberculosis* detection via rolling circle amplification, *Anal. Methods*, **3**, 267–273, doi: 10.1039/C0AY00529K.
 65. Cheng, Y., Zhang, X., Li, Z., Jiao, X., Wang, Y., and Zhang, Y. (2009) Highly sensitive determination of microRNA using target-primed and branched rolling-circle amplification, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **48**, 3268–3272, doi: 10.1002/anie.200805665.
 66. Deng, R., Tang, L., Tian, Q., Wang, Y., Lin, L., and Li, J. (2014) Toehold-initiated rolling circle amplification for visualizing individual microRNAs *in situ* in single cells, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **53**, 2389–2393, doi: 10.1002/anie.201309388.
 67. Mashimo, Y., Mie, M., Suzuki, S., and Kobatake, E. (2017) Detection of small RNA molecules by a combination of branched rolling circle amplification and bioluminescent pyrophosphate assay, *Anal. Bioanal. Chem.*, **401**, 221–227, doi: 10.1007/s00216-011-5083-3.
 68. Cui, W., Wang, L., Xu, X., Wang, Y., and Jiang, W. (2017) A loop-mediated cascade amplification strategy for highly sensitive detection of DNA methyltransferase activity, *Sens. Actuat. B: Chemical*, **244**, 599–605, doi: 10.1016/j.snb.2017.01.013.
 69. Qing, T., He, D., He, X., Wang, K., Xu, F., Wen, L., Shanguan, J., Mao, Z., and Lei, Y. (2016) Nucleic acid tool enzymes-aided signal amplification strategy for biochemical analysis: status and challenges, *Anal. Bioanal. Chem.*, **408**, 2793–2811, doi: 10.1007/s00216-015-9240-y.
 70. Dean, F.B., Nelson, J.R., Giesler, T.L., and Lasken, R.S. (2001) Rapid amplification of plasmid and phage DNA using Phi29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification, *Genome Res.*, **11**, 1095–1099, doi: 10.1101/gr.180501.
 71. Li, Y., Kim, H.J., Zheng, C., Chow, W.H.A., Lim, J., Keenan, B., Pan, X., Lemieux, B., and Kong, H. (2008) Primase-based whole genome amplification, *Nucleic Acids Res.*, **36**, e79, doi: 10.1093/nar/gkn377.
 72. Miao, P., Tang, Y., Wang, B., Yin, J., and Ning, L. (2015) Signal amplification by enzymatic tools for nucleic acids, *Trends Anal. Chem.*, **67**, 1–15, doi: 10.1016/j.trac.2014.12.006.
 73. Mol, C.D., Kuo, C.F., Thayer, M.M., Cunningham, R.P., and Tainer, J.A. (1995) Structure and function of the multifunctional DNA-repair enzyme exonuclease III, *Nature*, **374**, 381–386, doi: 10.1038/374381a0.
 74. Zuo, X., Xia, F., Xiao, Y., and Plaxco, K.W. (2010) Sensitive and selective amplified fluorescence DNA detection based on exonuclease III-aided target recycling, *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 1816–1818, doi: 10.1021/ja909551b.
 75. Yan, M., Bai, W., Zhu, C., Huang, Y., Yan, J., and Chen, A. (2016) Design of nuclease-based target recycling signal amplification in aptasensors, *Biosens. Bioelectron.*, **77**, 613–623, doi: 10.1016/j.bios.2015.10.015.
 76. Yang, W., Tian, J., Ma, Y., Wang, L., Zhao, Y., and Zhao, S. (2015) A label-free fluorescent probe based on DNA-templated silver nanoclusters and exonuclease III-assisted recycling amplification detection of nucleic acid, *Anal. Chim. Acta*, **900**, 90–96, doi: 10.1016/j.aca.2015.10.015.
 77. Xu, L., Shen, X., Li, B., Zhu, C., and Zhou, X. (2017) G-Quadruplex based Exo III-assisted signal amplification aptasensor for the colorimetric detection of adenosine, *Anal. Chim. Acta*, **980**, 58–64, doi: 10.1016/j.aca.2017.05.015.
 78. Gao, Y., and Li, B. (2013) G-Quadruplex DNAzyme-based chemiluminescence biosensing strategy for ultrasensitive DNA detection: combination of exonuclease III-assisted signal amplification and carbon nanotubes-assisted background reducing, *Anal. Chem.*, **85**, 11494–11500, doi: 10.1021/ac402728d.
 79. Gan, X., Zhao, H., Chen, S., and Quan, X. (2015) Electrochemical DNA sensor for specific detection of picomolar Hg (II) based on exonuclease III-assisted recycling signal amplification, *Analyst*, **140**, 2029–2036, doi: 10.1039/C5AN00082C.
 80. Yang, Z., Sismour, A.M., and Benner, S.A. (2007) Nucleoside α -thiotriphosphates, polymerases and the exonuclease III analysis of oligonucleotides containing phosphorothioate linkages, *Nucleic Acids Res.*, **35**, 3118–3127, doi: 10.1093/nar/gkm168.
 81. Xu, Q., Cao, A., Zhang, L.-F., and Zhang, C.-Y. (2012) Rapid and label-free monitoring of exonuclease III-assisted target recycling amplification, *Anal. Chem.*, **84**, 10845–10851, doi: 10.1021/ac303095z.
 82. Wang, Y., Wu, Y., Wang, Y., Zhou, B., and Wu, S. (2015) A sensitive immobilization-free electrochemical assay for T4PNK activity based on exonuclease III-assisted recycling, *RSC Adv.*, **5**, 75348–75353, doi: 10.1039/C5RA12849H.
 83. Li, W., Liu, X., Hou, T., Li, H., and Li, F. (2015) Ultrasensitive homogeneous electrochemical strategy for DNA methyltransferase activity assay based on autonomous exonuclease III-assisted isothermal cycling signal amplification, *Biosens. Bioelectron.*, **70**, 304–309, doi: 10.1016/j.bios.2015.03.060.
 84. Min, X., Xia, L., Zhuang, Y., Wang, X., Du, J., Zhang, X., Lou, X., and Xia, F. (2017) An AIEgens and exonuclease III aided quadratic amplification assay for detecting and cellular imaging of telomerase activity, *Sci. Bull.*, **62**, 997–1003, doi: 10.1016/j.scib.2017.06.008.

85. Yan, L., Nakayama, S., and Sintim, H.O. (2013) Probe design rules and effective enzymes for endonuclease-based detection of nucleic acids, *Bioorg. Med. Chem.*, **21**, 6181–6185, doi: 10.1016/j.bmc.2013.04.009.
86. Liu, S., Zhang, C., Ming, J., Wang, C., Liu, T., and Li, F. (2013) Amplified detection of DNA by an analyte-induced Y-shaped junction probe assembly followed with a nicking endonuclease-mediated autocatalytic recycling process, *Chem. Commun.*, 49, 7947–7949, doi: 10.1039/c3cc45211e.
87. Chen, M., Gan, N., Li, T., Wang, Y., Xu, Q., and Chen, Y. (2017) An electrochemical aptasensor for multiplex antibiotics detection using Y-shaped DNA-based metal ions encoded probes with NMOF substrate and CSR target-triggered amplification strategy, *Anal. Chim. Acta*, **968**, 30–39, doi: 10.1016/j.aca.2017.03.024.
88. Wang, Q., Yang, L., Yang, X., Wang, K., He, L., Zhu, J., and Su, T. (2012) An electrochemical DNA biosensor based on the “Y” junction structure and restriction endonuclease-aided target recycling strategy, *Chem. Commun.*, **48**, 2982–2984, doi: 10.1039/c2cc17679c.
89. Huang, Y., Wang, W., Wu, T., Xu, L.-P., Wen, Y., and Zhang, X. (2016) A three-line lateral flow biosensor for logic detection of microRNA based on Y-shaped junction DNA and target recycling amplification, *Anal. Bioanal. Chem.*, **408**, 8195–8202, doi: 10.1007/s00216-016-9925-x.
90. Zhao, Z., Chen, S., Wang, J., Su, J., Xu, J., Mathur, S., Fan, C., and Song, S. (2017) Nuclease-free target recycling signal amplification for ultrasensitive multiplexing DNA biosensing, *Biosens. Bioelectron.*, **94**, 605–608, doi: 10.1016/j.bios.2017.03.051.
91. Kiesling, T., Cox, K., Davidson, E.A., Dretchen, K., Grater, G., Hibbard, S., and Danielsen, M. (2007) Sequence specific detection of DNA using nicking endonuclease signal amplification (NESA), *Nucleic Acids Res.*, **35**, e117, doi: 10.1093/nar/gkm654.
92. Lin, Z., Yang, W., Zhang, G., Liu, Q., Qiu, B., Cai, Z., and Chen, G. (2011) An ultrasensitive colorimeter assay strategy for p53 mutation assisted by nicking endonuclease signal amplification, *Chem. Commun.*, **47**, 9069–9071, doi: 10.1039/C1CC13146J.
93. Chen, J., Zhang, J., Li, J., Fu, F., Yang, H.H., and Chen, G. (2010) An ultrahighly sensitive and selective electrochemical DNA sensor via nicking endonuclease assisted current change amplification, *Chem. Commun.*, **46**, 5939–5941, doi: 10.1039/c0cc00748j.
94. Vijayan, A.N., Liu, Z., Zhao, H., and Zhang, P. (2019) Nicking enzyme-assisted signal-amplifiable Hg²⁺ detection using upconversion nanoparticles, *Anal. Chim. Acta*, **1072**, 75–80, doi: 10.1016/j.aca.2019.05.001.
95. Xie, L.S., Li, T.H., Hu, F.T., Jiang, Q.L., Wang, Q.Q., and Gan, N. (2019) A novel microfluidic chip and antibody-aptamer based multianalysis method for simultaneous determination of several tumor markers with polymerization nicking reactions for homogenous signal amplification, *Microchem. J.*, **147**, 454–462, doi: 10.1016/j.microc.2019.03.028.
96. Guo, Q., Yang, X., Wang, K., Tan, W., Li, W., Tang, H., and Li, H. (2009) Sensitive fluorescence detection of nucleic acids based on isothermal circular strand-displacement polymerization reaction, *Nucleic Acids Res.*, **37**, e20, doi: 10.1093/nar/gkn1024.
97. Giuffrida, M.C., Zanolli, L.M., D’Agata, R., Finotti, A., Gambari, R., and Spoto, G. (2015) Isothermal circular-strand-displacement polymerization of DNA and microRNA in digital microfluidic devices, *Anal. Bioanal. Chem.*, **407**, 1533–1543, doi: 10.1007/s00216-014-8405-4.
98. Gao, F., Du, L., Zhang, Y., Tang, D., and Du, Y. (2015) Molecular beacon mediated circular strand displacement strategy for constructing a ratiometric electrochemical deoxyribonucleic acid sensor, *Anal. Chim. Acta*, **883**, 67–73, doi: 10.1016/j.aca.2015.04.058.
99. Wang, T., Zhang, Z., Li, Y., and Xie, G. (2015) Amplified electrochemical detection of *mecA* gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* based on target recycling amplification and isothermal strand-displacement polymerization reaction, *Sens. Actuat. B: Chemical*, **221**, 148–154, doi: 10.1016/j.snb.2015.06.057.
100. Dirks, R.M., and Pierce, N.A. (2004) Triggered amplification by hybridization chain reaction, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 15275–15278, doi: 10.1073/pnas.0407024101.
101. Xuan, F., and Hsing, I.M. (2014) Triggering hairpin-free chain-branching growth of fluorescent DNA dendrimers for nonlinear hybridization chain reaction, *J. Am. Chem. Soc.*, **136**, 9810–9813, doi: 10.1021/ja502904s.
102. Bi, S., Chen, M., Jia, X., Dong, Y., and Wang, Z. (2015) Hyperbranched hybridization chain reaction for triggered signal amplification and concatenated logic circuits, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **54**, 8144–8148, doi: 10.1002/anie.201501457.
103. Yang, X., Yuebo, Yu, Y., and Gao, Z. (2014) A highly sensitive plasmonic DNA assay based on triangular silver nanoprisms etching, *ACS Nano*, **85**, 4902–4907, doi: 10.1021/nn5008786.
104. Miao, P., Tang, Y., and Yin, J. (2015) MicroRNA detection based on analyte triggered nanoparticle localization on a tetrahedral DNA modified electrode followed by hybridization chain reaction dual amplification, *Chem. Commun.*, **51**, 15629–15632, doi: 10.1039/C5CC05499K.
105. Wu, Z., Liu, G.-Q., Yang, X.-L., and Jiang, J.-H. (2015) Electrostatic nucleic acid nanoassembly enables hybridization chain reaction in living cells for ultrasensitive mRNA imaging, *J. Am. Chem. Soc.*, **137**, 6829–6836, doi: 10.1021/jacs.5b01778.
106. Guo, J., Wang, J., Zhao, J., Guo, Z., and Zhang, Y. (2016) Ultrasensitive multiplexed immunoassay for tumor biomarkers based on DNA hybridization chain reaction amplifying signal, *ACS Appl. Materials Interfaces*, **8**, 6898–6904, doi: 10.1021/acsami.6b00756.
107. Jie, G., and Jie, G. (2016) Sensitive electrochemiluminescence detection of cancer cells based on a CdSe/ZnS quantum dot nanocluster by multibranching hybridization chain reaction on gold nanoparticles, *RSC Adv.*, **6**, 24780–24785, doi: 10.1039/C6RA00750C.
108. Choi, H.M.T., Chang, J.Y., Trinh, L.A., Padilla, J.E., Fraser, S.E., and Pierce, N.F. (2010) Programmable *in situ* amplification for multiplexed imaging of mRNA expression, *Nat. Biotechnol.*, **28**, 1208–1214, doi: 10.1038/nbt.1692.
109. Bertoli, G., Cava, C., and Castiglioni, I. (2015) MicroRNAs: new biomarkers for diagnosis prognosis, therapy prediction and therapeutic tools for breast cancer, *Theranostics*, **5**, 1122–1143, doi: 10.7150/thno.11543.
110. Zhang, J., Zhang, W., and Gu, Y. (2018) Enzyme-free isothermal target-recycled amplification combined with PAGE for direct detection of microRNA-21, *Anal. Biochem.*, **550**, 117–122, doi: 10.1016/j.ab.2018.04.024.
111. Shuai, H.-L., Huang, K.-J., Xing, L.-L., and Chen, Y.-X. (2016) Ultrasensitive electrochemical sensing platform for microRNA based on tungsten oxide-graphene composites coupling with catalyzed hairpin assembly target recycling and enzyme signal amplification, *Biosens. Bioelectron.*, **86**, 337–345, doi: 10.1016/j.bios.2016.06.057.
112. Jiang, Z., Wang, H., Zhang, X., Liu, C., and Li, Z. (2014) An enzyme-free signal amplification strategy for sensitive detection of microRNA via catalyzed hairpin assembly, *Anal. Methods*, **6**, 9477–9482, doi: 10.1039/C4AY02142H.
113. Dong, G., Dai, J., Jin, L., Shi, H., Wang, F., Zhou, C., Zheng, B., Guo, Y., and Dan Xiao, D. (2019) A rapid room-temperature DNA amplification and detection strat-

- egy based on nicking endonuclease and catalyzed hairpin assembly, *Anal. Methods*, **11**, 2537–2541, doi: 10.1039/C9AY00507B.
114. Xu, J., Guo, J., Maina, S.W., Yang, Y., Hu, Y., Li, X., Qiu, J., and Xin, Z. (2018) An aptasensor for *Staphylococcus aureus* based on nicking enzyme amplification reaction and rolling circle amplification, *Anal. Biochem.*, **549**, 136–142, doi: 10.1016/j.ab.2018.03.013.
 115. Chen, D., Zhang, M., Ma, M., Hai, H., Li, J., and Shan, Y. (2019) A novel electrochemical DNA biosensor for transgenic soybean detection based on triple signal amplification, *Anal. Chim. Acta*, **1078**, 24–31, doi: 10.1016/j.aca.2019.05.074.
 116. Song, H., Yang, Z., Jiang, M., Zhang, G., Gao, Y., and Shen, Z., Wu, Z.-S., and Lou, Y. (2019) Target-catalyzed hairpin structure-mediated padlock cyclization for ultra-sensitive rolling circle amplification, *Talanta*, **204**, 29–35, doi: 10.1016/j.talanta.2019.05.057.
 117. Chen, J., and Zhou, S. (2016) Label-free DNA Y junction for bisphenol A monitoring using exonuclease III-based signal protection strategy, *Biosens. Bioelectron.*, **77**, 277–283, doi: 10.1016/j.bios.2015.09.042.
 118. Sun, J., Jiang, W., Zhu, J., Li, W., and Wang, L. (2015) Label-free fluorescence dual-amplified detection of adenosine based on exonuclease III-assisted DNA cycling and hybridization chain reaction, *Biosens. Bioelectron.*, **70**, 15–20, doi: 10.1016/j.bios.2015.03.014.
 119. Bi, S., Li, L., and Cui, Y. (2012) Exonuclease-assisted cascaded recycling amplification for label-free detection of DNA, *Chem. Commun.*, **48**, 1018–1020, doi: 10.1039/c1cc16684k.
 120. D'Agata, R., and Spoto, G. (2019) Advanced methods for microRNA biosensing: a problem-solving perspective, *Anal. Bioanal. Chem.*, **411**, 4425–4444, doi: 10.1007/s00216-019-01621-8.

ISOTHERMAL AMPLIFICATION METHODS OF NUCLEIC ACIDS AND THEIR APPLICATION IN BIOANALYSIS

Review

O. L. Bodulev and I. Yu. Sakharov*

Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry, 119991 Moscow, Russia; E-mail: sakharovivan@gmail.com

Received August 13, 2019

Revised November 1, 2019

Accepted November 1, 2019

In recent years, isothermal amplification methods of nucleic acids are intensely developed as an alternative of polymerase chain reaction (PCR). The advantage of these methods is that the amplification of nucleic acids is carried out at a constant temperature, in contrast to PCR, which requires a cyclic change in temperature. In addition, isothermal amplification of nucleic acids can be carried out directly in living cells. This review presents the principles of the isothermal amplification methods and demonstrates their high efficiency in the construction of new highly sensitive methods for the analysis of both nucleic acids and enzymes responsible for their modification. Moreover, data are presented on their successful application in bioanalysis of cells and biomolecules with the use of DNA/RNA aptamers.

Keywords: nucleic acids, amplification, isothermal, bioanalysis, aptamers