

УДК 543.94

НЕСПЕЦИФИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В РЕАКЦИЯХ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ

Обзор

© 2021 Н.В. Зырина^{1,2}, В.Н. Антипова^{2*}

¹ Институт белка РАН, 142290 Пущино, Московская обл., Россия

² Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 142290 Пущино, Московская обл., Россия; электронная почта: valery_a@rambler.ru

Поступила в редакцию 10.02.2021

После доработки 16.04.2021

Принята к публикации 16.04.2021

В обзоре рассматривается проблема образования неспецифических продуктов при использовании различных методов изотермической амплификации как результат действия целого ряда факторов: неспецифических взаимодействий праймеров, синтеза ДНК *ab initio* и проявления дополнительных активностей ДНК-полимераз. Обсуждаются разрабатываемые подходы для устранения неспецифического синтеза в методах LAMP, RPA, NASBA, RCA, SDA, LSDA, NDA и EXPAR.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: изотермическая амплификация, фоновый синтез, ДНК-полимеразы, LAMP, SDA, EXPAR.

DOI: 10.31857/S0320972521070101

ВВЕДЕНИЕ

Изотермические методы амплификации нуклеиновых кислот разрабатываются как альтернатива ПЦР, их применение особенно актуально при проведении диагностики непосредственно в местах оказания медицинской помощи [1–3]. С 2000-х годов некоторые методы поставлены на коммерческую основу, например, созданы наборы NUCLISENS («bioMérieux», Франция), Illustra TempliPhi™ («Cytiva», США), WarmStart® LAMP Kit («NEB», США) и LavaLAMP™ DNA Master Mix («Lucigen», США). В первую очередь изотермическая амплификация нашла практическое применение в обнаружении патогенных микроорганизмов и

вирусов в клинических образцах [4]. Все чаще она применяется при разработке новых стратегий оценки безопасности пищевых продуктов и мониторинга окружающей среды, при генотипировании и обнаружении некодирующих РНК, целевых белков, небольших молекул и ионов металлов, а также для конструирования нуклеиновых кислот с заданными наноструктурами, гидрогелей, наноматериалов и приборов [5, 6]. Все разнообразие методов изотермической амплификации исчерпывающе описано в работах, процитированных выше.

Тем не менее существует проблема, возникающая с «завидной» регулярностью и накладывающая ограничения на использование изотермической амплификации в качестве альтернативы ПЦР. Она заключается в появлении неспецифических продуктов реакции, критически препятствующих идентификации или синтезу специфических последовательностей в препаративных количествах. Наличие таких продуктов приводит к ложноположительным результатам, отрицательно влияет и на чувствительность метода, и на его специфичность, а также накладывает ограничение на максимальную длину синтезируемого фрагмента. Несмотря на актуальность обозначенной проблемы, ей не уделяется должного внимания. Работ, направленных именно на изучение явления неспецифического синтеза при использовании методов изотерми-

Принятые сокращения: EXPAR – экспоненциальная реакция амплификации нуклеиновых кислот (exponential amplification reaction); LAMP – петлевая изотермическая амплификация (loop-mediated isothermal amplification); NASBA – амплификация на основе последовательности нуклеиновой кислоты (nucleic acid sequence-based amplification); PNA – пептидная нуклеиновая кислота (peptide nucleic acid); RCA – амплификация по типу катящегося кольца (rolling circle amplification); SDA – амплификация с замещением цепи (strand displacement amplification); RPA – рекомбиназная полимеразная амплификация (recombinase polymerase amplification); SSB – белок, связывающий одноцепочечную ДНК (single-strand binding protein).

* Адресат для корреспонденции.

ческой амплификации, не так много. Как правило, в статьях, касающихся появления нового метода, о наличии фонового синтеза упоминается лишь поверхностно. В данном обзоре мы постарались обобщить данные исследований, посвященных проблеме появления неспецифических продуктов при использовании различных методов изотермической амплификации или акцентирующих внимание на разрабатываемых подходах для устранения этих продуктов.

Существует несколько основных причин возникновения неспецифических продуктов: образование комплементарными участками праймеров димеров и шпилек, способных к удлинению ДНК-полимеразой; взаимодействие праймеров с матрицей в неспецифических участках; дополнительные активности ДНК-полимераз, а также синтез ДНК *ab initio*.

НЕСПЕЦИФИЧЕСКИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПРАЙМЕРОВ

При использовании методов изотермической амплификации, перечисленных ниже, основной причиной образования неспецифических продуктов считают нежелательные взаимодействия комплементарных участков праймеров с образованием димеров и шпилек, способных к удлинению с участием ДНК-полимеразы, а также неспецифические взаимодействия праймеров с матрицей.

Метод петлевой изотермической амплификации (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) позволяет нарабатывать целевую последовательность двухцепочечной ДНК за счёт самопраймирования шпилечными структурами, которые образуются в ходе реакции [7]. Для этого конструируется набор праймеров: пара внешних (буферных) и пара внутренних. Внешние праймеры являются вспомогательными и служат для вытеснения цепей, синтезированных с внутренних праймеров, комплементарных целевым последовательностям. Внутренние праймеры конструируются так, чтобы при дальнейшем синтезе ДНК образовывались инвертированные повторы, замыкающиеся в шпилечные структуры (рис. 1). На каждом последующем этапе реакции собираются все более сложные тандемные шпилечные структуры, каждая из которых содержит копию целевой последовательности. В реакции используют ДНК-полимеразу Bst, которая обладает активностью замещения цепи и способна проходить шпилечные структуры без диссоциации от матрицы.

Несмотря на заверения авторов метода о незначительности неспецифической амплифи-

кации за счет стратегии праймирования и довольно высокой температуры реакции (60 °C), эта амплификация не исключается полностью; ее основной причиной считают образование димеров праймеров [8]. Первоначально обратный внутренний праймер формирует гомодимер. Достаивание полимеразой его 3'-конца приводит к образованию двухцепочечного продукта, содержащего фрагмент этого же праймера в обратной ориентации. 5'-Конец такого продукта в процессе спонтанной обратимой денатурации может гибридизоваться с 3'-концом прямого внутреннего праймера, образуя прерванную матрицу. На этой матрице ДНК-полимераза Bst ведет дальнейший синтез комплементарной цепи ДНК, используя, в свою очередь, денатурировавший 3'-конец обратного внутреннего праймера, синтезируя при этом последовательность, комплементарную прямому внутреннему праймеру. Дойдя до конца матрицы, ДНК-полимераза может далее наращивать длину цепи путем вытеснения последовательностей, использовавшихся в качестве матрицы на предыдущем этапе. Эти процессы приводят к образованию внутримолекулярных шпилек, служащих праймерами для дальнейшей амплификации. Независимо от последовательности матрицы полимеразы может добавлять от одного до нескольких нуклеотидов, что приводит к появлению пула шпилек, 3'-концы которых содержат некоторое количество случайных нуклеотидов. Последовательности с комплементарными 3'-концами селективно амплифицируются *in vitro*. Двухцепочечный продукт этой амплификации посредством внутримолекулярной водородной связи может образовывать структуру, подобную гантели, и амплифицироваться по стандартному механизму LAMP. Для улучшения аналитической специфичности анализа в реакции LAMP предложили исключить обнаружение продуктов неспецифической амплификации, детектируя только амплификацию мишени с помощью зондов, маяков, флуоресцентного (Фёрстеровского) резонансного переноса энергии (FRET) или схем «репортер-гаситель» [8]. Другой подход заключается в использовании оригинальной математической модели, позволяющей предсказывать размер, количество и специфичность искомым продуктам в зависимости от целевой ДНК, набора праймеров, а также условий реакции. Эта модель была разработана авторами на основе экспериментальных данных с использованием электрофореза на чипе, позволяющем оценить структуры, которые образуются в ходе реакции LAMP [9]. Еще один способ снижения количества неспецифических продуктов – внесение в реакцию пуллулана и других химических

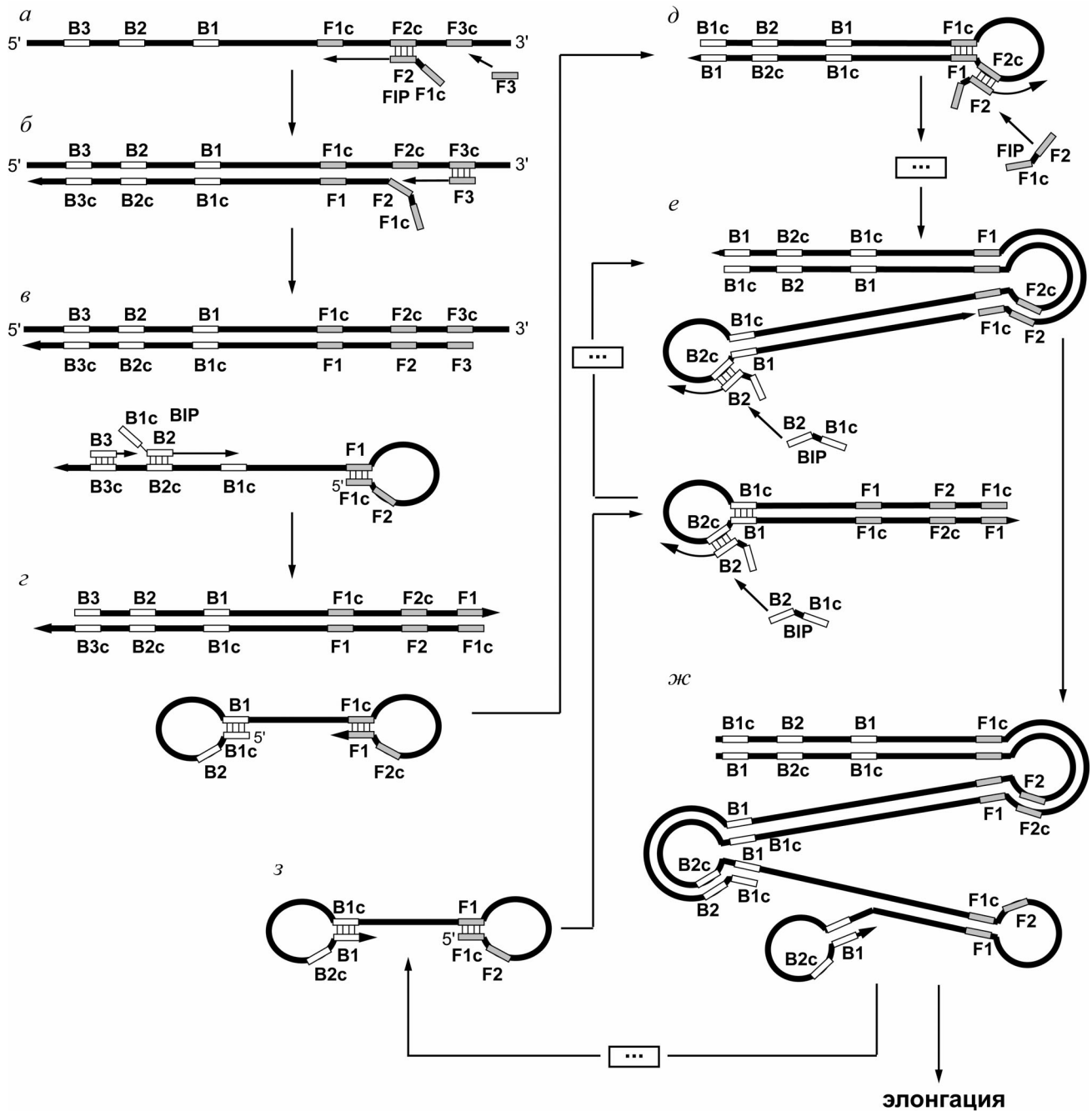


Рис. 1. Основные этапы петлевой изотермической амплификации: *a–г* – образование стартового продукта; *д–з* – циклический синтез и элонгация ДНК со шпилечными структурами. F2c и B2 – фланги, F1c и B1 – внутренние участки целевой (амплифицируемой) последовательности, F3c и B3 – «внешние» последовательности; FIP (forward inner primer) – прямой внутренний праймер с участками F1c и F2, VIP (backward inner primer) – обратный внутренний праймер с участками B1c и B2, F3 – внешний (буферный) прямой праймер, B3 – внешний (буферный) обратный праймер. Прямоугольниками обозначены комплементарные последовательности: серые – F1c и F1, F2c и F2, F3c и F3, белые – B1c и B1, B2c и B2, B3c и B3, где c – обозначение комплементарной цепи. Стрелки – направление синтеза, |||| – гибридизация, ... – промежуточные продукты. Начало процесса показано с праймера FIP; следует помнить, что синтез начинается и с праймера VIP. Предложено согласно работе Notomi et al. [7]

соединений, предположительно, стабилизирующих структуру праймеров и предотвращающих формирование их димеров в отсутствие целевой ДНК [10].

Рекомбиназная полимеразная амплификация (recombinase polymerase amplification, RPA) основана на использовании рекомбиназы, которая катализирует гибридизацию пары праймеров с

гомологичными последовательностями амплифицируемого участка матрицы с последующей элонгацией с помощью ДНК-полимеразы *Bsu*, обладающей свойством замещения цепи. Стабилизацию получаемых в процессе реакции промежуточных продуктов обеспечивает белок, связывающий одноцепочечную ДНК (single-stranded DNA binding protein, SSB) [11]. Появление неспецифических продуктов в данной реакции объясняют нежелательными взаимодействиями между праймерами при невысокой температуре процесса (37 °C). Для уменьшения этих взаимодействий предлагается использовать олигонуклеотид, содержащий тетрагидрофурановый миметик апурин-апиримидинового сайта (AP-сайта), фланкированный флуорофором и гасителем, а также 3'-конец, заблокированный дидеоксицитозином (ddC). Флуоресценция интактной конструкции находится на низком уровне, а блок на 3'-конец не позволяет олигонуклеотиду выступать в качестве праймера в реакции амплификации. После гибридизации олигонуклеотида с матричной ДНК эндонуклеаза IV *E. coli* узнает и расщепляет миметик AP-сайта, флуоресценция усиливается, образуется свободный 3'-конец на разрезанной цепи праймера, который удлиняется полимеразой. Значительно снизить образование димеров праймеров позволяет принцип самоисключающего молекулярного распознавания (self-avoiding molecular recognition systems, SAMRS) [12]. Праймеры не взаимодействуют друг с другом, а связываются исключительно с флангами целевой последовательности за счет замены естественных нуклеотидов в некоторых положениях на нуклеотидные аналоги. Для увеличения специфичности взаимодействия олигонуклеотидов и ДНК, было предложено использовать пептидные нуклеиновые кислоты (PNAs) [13], однако гибридизация PNA с целевой последовательностью требует отдельного этапа реакции. Для снижения вероятности неспецифической гибридизации праймеров особое внимание рекомендуется уделять их дизайну [14, 15]. Пакет PrimedRPA позволяет автоматизировать создание праймеров и наборов зондов [16]. Причиной неспецифической амплификации также может быть гибридизация праймеров с «фоновой» (тотальной) ДНК, присутствующей в реакции вместе с целевыми последовательностями, например, в образцах крови или окружающей среде [17]. С проблемой позволяет справиться метод «обогащения» реакции, основанный на связывании целевой ДНК с иммобилизованным олигонуклеотидом с последующим ее элюированием в реакционную смесь после удаления примесей.

Амплификация на основе последовательности нуклеиновой кислоты (nucleic acid sequence-based amplification, NASBA) разработана для амплификации РНК. ДНК можно амплифицировать этим способом в том случае, если она вступает в реакцию в одноцепочечной форме [18]. Экспоненциальная амплификация целевых последовательностей РНК происходит за счет сопряженных реакций обратной транскрипции, транскрипции интермедиатов кДНК и удаления РНКазой Н цепи РНК с кДНК. Несмотря на высокую специфичность реакции NASBA, проблема появления продуктов, приводящих к ложноположительным результатам, все же существует [19]. В качестве основной причины традиционно рассматривается неспецифическая гибридизация и димеризация праймеров [20]. Для ее устранения рекомендуется проводить оптимизацию условий реакции и тщательный расчет изменения свободной энергии Гиббса (ΔG) и температуры плавления (T_m) при конструировании праймеров, например, с помощью сетевого ресурса DINAMelt [21]. NASBA позволяет с высокой точностью выявлять целевую РНК в присутствии фоновой двухцепочечной ДНК [22]. Наличие большого количества фоновой РНК может мешать амплификации целевых последовательностей, но эта проблема устранима разведением исследуемого образца [23]. Проблема неспецифического синтеза в NASBA стоит наименее остро, что позволяет использовать эту реакцию для развития диагностических методов [24].

Амплификация по типу катящегося кольца (rolling circle amplification, RCA) осуществляется на ковалентно замкнутом олигонуклеотиде (зонде), гибридизованном с целевой последовательностью ДНК [25]. С участком зонда также гибридизуется другой олигонуклеотид, после чего ДНК-полимераза удлиняет его, проходя множество раз «по кольцу» зонда, синтезируя его тандемные копии, включающие в себя последовательность целевой ДНК.

В мультипраймерной RCA, или амплификации с множественным замещением цепи (multiple displacement amplification, MDA), с кольцевым олигонуклеотидом или с продуктами реакции гибридизуется несколько праймеров [25–27]. В реакциях используют ДНК-полимеразы phi29 или *Bst*, а также белок SSB gp32 фага T4 (T4 gp32). В одной из первых работ по данному методу было показано, что стандартная денатурация двухцепочечной матрицы ДНК приводила к ее деградации, после чего специфичность реакции снижалась, а большая часть продуктов представляла собой артефакт амплификации, не содержащий целевой последовательности [27]. Неспецифи-

ческие высокомолекулярные (более 10 тыс. п.н.) продукты амплификации геномной ДНК были обнаружены в контрольных образцах, куда добавляли олигонуклеотиды и дезоксинуклеотиды (dNTPs), но не добавляли матрицу [28]. Их образование объяснили самопраймированием с последующей амплификацией. Устранить нежелательную реакцию удалось с помощью введения в последовательности праймеров спейсера С3 (фосфорамидитного) или спейсера С18 (гексаэтиленгликоля) на некотором расстоянии от 5'-концов. Олигонуклеотиды с такими модификациями имели возможность гибридизоваться с целевыми последовательностями, но не могли служить матрицами в том случае, если произошло самопраймирование. С проблемой появления неспецифических высокомолекулярных продуктов в контрольных образцах, не содержащих матрицу, столкнулись и при проведении RCA с добавлением никующей эндонуклеазы (PG-RCA), но связали это с неспецифической полимеризацией субстратов ДНК-полимеразой [29]. Снижения уровня неспецифической амплификации удалось достичь оптимизацией условий реакции: уменьшением концентраций dNTPs и ДНК-полимеразы, подбором оптимальной концентрации хлорида магния. Изменение температуры реакции, добавление веществ, увеличивающих эффективность реакции, или наоборот, ингибиторов ДНК-полимеразы, на уровень неспецифического синтеза не влияли.

Продукты неспецифической амплификации в виде набора мультимеров (тандемно расположенных повторов последовательности исходной ДНК-матрицы), синтезируемые полимеразой Bst, оказалось невозможным отличить от продуктов реакции RCA, результатом которой также является набор ДНК кратной длины (конкатемеров), поскольку на электрофореграмме и те и другие проявляются в виде лестницы фрагментов [30]. Существенным условием для мультимеризации является наличие коротких (50–60 п.н.) ДНК-дуплексов, образующихся за счет удлинения праймера в гомо- и гетеродимерах или после отжига на матрице. Эффективность мультимеризации зависит от условий реакции: наибольшая наблюдается в буферах с высокой концентрацией соли в присутствии восстановителей (β -меркаптоэтанол) и при субоптимальной для ДНК-полимеразы температуре реакции. Формирования нежелательных мультимеров в реакциях с ДНК-полимеразой Bst можно избежать, используя краситель SYBR Green I. Образование мультимеров на линейной одноцепочечной матрице ДНК с одним праймером в изотермических условиях описали

Wang et al. [31]. Предложенный механизм включает следующие основные этапы: гибридизацию и удлинение праймера на олигонуклеотидной матрице, гибридизацию выступающего 3'-конца матрицы с участком продукта удлинения праймера «своего» же дуплекса за счет ошибочного спаривания, последующее связывание полимеразой этого комплекса и удлинение 3'-конца матрицы (рис. 2). Многократная инициация синтеза как праймерами, так и одноцепочечными продуктами реакции вызывает экспоненциальное накопление длинных мультимерных продуктов. Такая амплификация иницируется только способными к замещению цепи и обратной транскрипции ДНК-полимеразами Bst, Bsm и VcaBEST.

Для предотвращения мультимеризации ДНК было предложено использовать праймеры с модифицированными межнуклеотидными фосфатными группами [32]. Введение трех и более фосфорилгуанидиновых групп в центр праймеров предотвращало мультимеризацию и при этом не ингибировало специфическую амплификацию. Для общего подавления синтеза побочных продуктов использовали белок SSB *Thermus thermophilus* [33, 34].

Амплификации с замещением цепи (strand displacement amplification, SDA) основана на внесении эндонуклеазой рестрикции одноцепочечного разрыва (ника) в немодифицированную цепь целевой последовательности двухцепочечной ДНК и удлинении ДНК-полимеразой 3'-конца этого ника с вытеснением цепи исходного дуплекса в ходе синтеза новой цепи. Вытесненная цепь, в свою очередь, служит матрицей для синтеза комплементарной цепи [35].

Дальнейшее развитие метод SDA получил с открытием никующих эндонуклеаз (никаз). Эти ферменты узнают определенную последовательность, подобно эндонуклеазам рестрикции, но гидролизуют только одну из цепей. На основе никаз предложен целый ряд методов изотермической амплификации ДНК [36–40] (подробно в обзорной статье [41]). Наиболее распространен метод **экспоненциальной реакции амплификации нуклеиновых кислот (exponential amplification reaction, EXPAR)**, в котором амплифицируют олигонуклеотидные последовательности ДНК, используя термофильные ферменты – никазу Nt.BstNBI и ДНК-полимеразу Bst (рис. 3, а–г) [37].

Проблема синтеза побочных продуктов, интерферирующих с целевыми, стала ключевой уже с появления первых работ по данному методу [35, 42]. Их наличие объясняли неспецифическим связыванием праймеров с тотальной ДНК, присутствующей в образцах, или образо-

ванием димеров праймеров с последующей амплификацией в случае проведения реакции при невысокой температуре [42, 43]. Однако повышение температуры реакции и замена мезофильных ферментов *exo*-фрагмента Кленова и эндонуклеазы *HincII* термофильными эндонуклеазами рестрикции и ДНК-полимеразами с лучшей активностью вытеснения цепи и процессивностью не позволило полностью решить проблему [43, 44]. Изучены возможности устранения неспецифических взаимодействий путем оптимизации праймеров для реакций SDA [45]. Продукты, образующиеся в результате таких взаимодействий, выявляли на электрофореграмме в виде лестницы фрагментов. Секвенирование этих продуктов показало, что они образованы путем конкатемеризации праймера. Для решения этой проблемы с целью повышения точности гибридизации праймеров с целевой последовательностью был разработан компьютерный алгоритм.

В EXPAR неспецифический фоновый синтез отмечали на начальных этапах реакции (ранняя фаза) [46]. Было выдвинуто предположение, что полимераза связывается с одноцепочечной матрицей и полимеризует на ней dNTPs, не требуя праймера. Неспецифический синтез удавалось значительно снизить, прогревая реакционную

смесь перед внесением dNTPs и ДНК-полимеразы. Проблеме устранения фоновой амплификации на начальных этапах EXPAR посвящена также работа Raid et al. [47]. В качестве причины неспецифического синтеза в ней рассматривали возможность достраивания полимеразой 3'-концов матрицы, формирующихся в результате временных взаимодействий: внутримолекулярной гибридизации одной матрицы (формирование шпильки), межмолекулярной гибридизации 3'-конца одной матрицы с каким-либо участком другой матрицы EXPAR, взаимодействия нескольких участков одной матрицы с участками другой. Для решения этих проблем было предложено две стратегии: блокирование 3'-конца матрицы, например, с помощью пептидной нуклеиновой кислоты, и независимое от последовательности ослабление взаимодействий матрица–матрица. Добавление белка SSB *E. coli* для снижения взаимодействий матриц EXPAR приводило к снижению неспецифической амплификации на три порядка.

Еще одной причиной синтеза неспецифических продуктов в реакциях изотермической амплификации ДНК может быть неконтролируемая активность используемых нуклеаз [41]. Для регулирования активности предложили добавлять в реакционную смесь модуляторы актив-

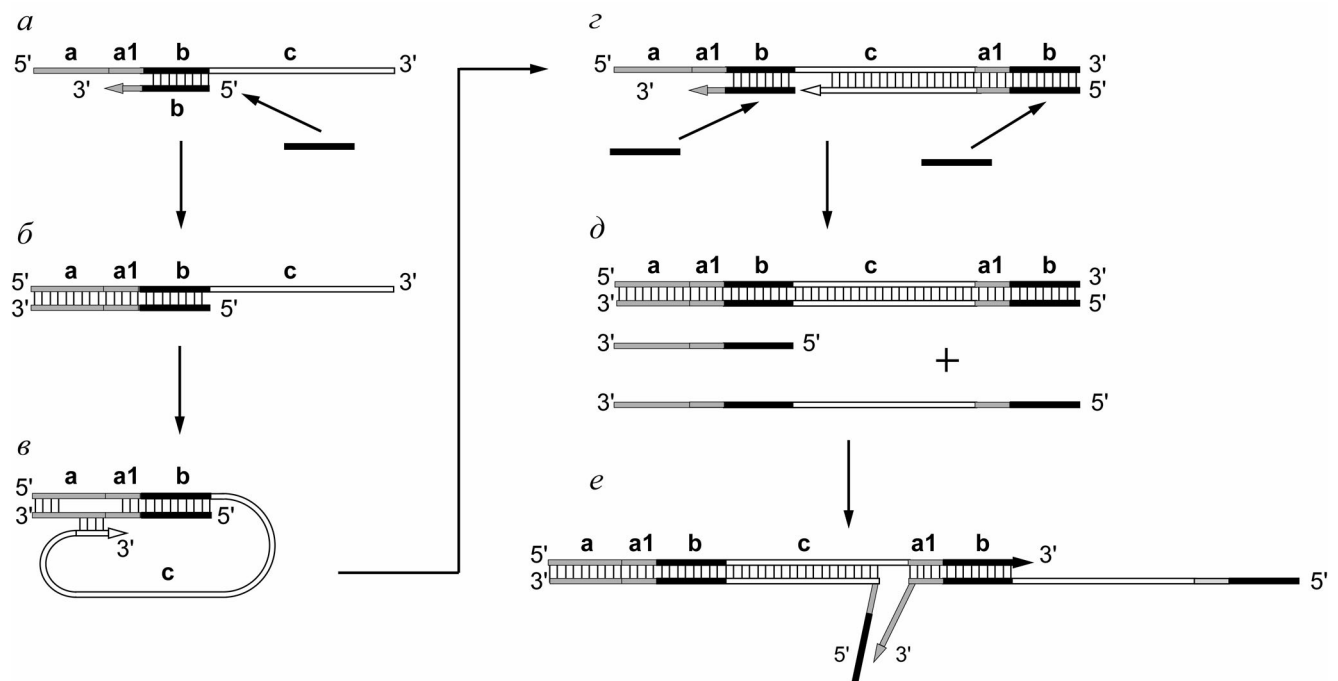


Рис. 2. Основные этапы образования мультимеров на линейной одноцепочечной матрице: *a, б* – гибридизация и удлинение праймера; *в* – ошибочное спаривание выступающего 3'-конца матрицы с удлиненным праймером в дуплексе и начало копирования цепи удлиненного праймера; *г, д, е* – образование мультимерных продуктов. *a, a1, b, c* – последовательности на матрице; одинаковые цвета обозначают комплементарные участки матрицы и праймера или продукта синтеза, стрелки – направление синтеза. Предложено согласно работе Wang et al. [31]

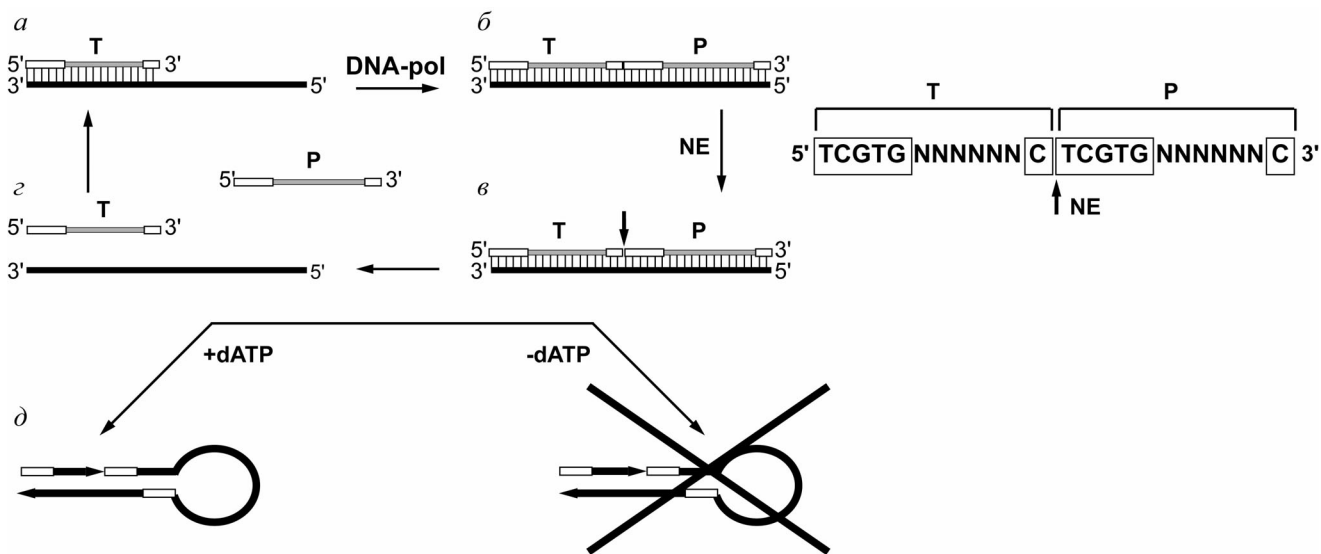


Рис. 3. Метод EXPAR, синтез целевого и неспецифических продуктов: *a* – гибридизация олигонуклеотида-триггера, содержащего часть последовательности сайта узнавания никазы на матрице; *б* – удлинение триггера ДНК-полимеразой и образование полного сайта узнавания никазы (в рамке) и олигонуклеотидного продукта; *в* – гидролиз сайта никазы; *г* – диссоциация комплекса между триггером, продуктом и матрицей; *д* – побочная реакция образования неспецифических продуктов. Последовательность, синтезируемая на матрице, вынесена отдельно: Т – олигонуклеотид-триггер, Р – олигонуклеотид-продукт, в рамке – сайт узнавания никазы, DNA-pol – ДНК-полимераза, NE – никаза, N – любой нуклеотид. Предложено согласно работам Van Ness et al., Urtel et al. [37, 52]

ности никаз – короткие (до 30 п.н.) синтетические дуплексы ДНК. При температуре 20 °С эти дуплексы образуют непродуктивный комплекс с ферментом и блокируют его активность. Повышение температуры до 40–50 °С вызывает диссоциацию комплекса никазы и дуплекса-ингибитора, приводя к инициации гидролиза целевой ДНК. Однако авторы подхода не показали результат его практического применения в SDA, а именно устранение неспецифических продуктов реакции.

И, наконец, в качестве общей стратегии улучшения аналитической специфичности метода SDA было предложено использовать схемы, определяющие только специфическую амплификацию целевой последовательности [44, 48]. Среди множества методов, использующих эту стратегию, интересной представляется изотермическая амплификация, основанная на зависимой от матрицы элонгации (template-dependent extension based isothermal amplification, TEIA), поскольку при ее разработке максимально учитывали причины появления неспецифических продуктов [39].

СИНТЕЗ ДНК *ab initio*

Причиной появления побочных продуктов в реакциях изотермической амплификации мо-

жет выступать синтез ДНК *ab initio*, или безматричный синтез [29, 38, 46, 49–52]. Этот феномен представляет собой способность ДНК-полимераз синтезировать ДНК без добавления какой-либо ДНК или РНК в реакционную смесь [53]. Результатом синтеза является спектр продуктов от нескольких десятков до десятков тысяч п.н. Скорость синтеза ДНК *ab initio* значительно увеличивается при добавлении в реакционную смесь эндонуклеаз рестрикции и никаз [54–56], а также праймазы или хеликазы [57, 58]. Синтез ДНК в отсутствие матрицы и праймера впервые был обнаружен Корнбергом и его коллегами [59]. Однако научная общественность скептически отнеслась к этим данным, считая, что синтез мог проходить за счет примесей ДНК или присутствующих в препаратах ДНК-полимераз других ферментов, способных иницировать непраймируемый синтез. Спустя 30 лет японские исследователи, работая с термофильными ДНК-полимеразами Tli и Tth, вновь открыли это явление [60, 61]. Для освобождения от возможных примесей они использовали высокоочищенные реактивы и полимеразы, обрабатывали ДНКазой I и РНКазой A белки, участвующие в реакции, денатурировали с последующей ренатурацией ДНК-полимеразы, дополнительно очищали dNTPs и др. Все эти обработки не снижали способности ДНК-полимеразы вести синтез *ab initio*. Интересно, что механизм иници-

циации синтеза *ab initio* до сих пор не известен. Предполагают, что первые олигонуклеотиды синтезируются самой ДНК-полимеразой непосредственно из dNTPs [53]. Из олигонуклеотидов с различными последовательностями дальнейшей амплификации подвергаются палиндромные последовательности, т.к. они могут образовывать шпильки на 3'-концах молекулы при частичном «плавлении» концов и выступать в качестве праймеров в синтезе ДНК. Этот процесс может происходить непрерывно, причем шпильчатая структура может возникнуть и инициировать элонгацию цепи даже за счет ошибочного спаривания нуклеотидов на 3'-конце олигонуклеотида.

Изучена возможность ингибирования синтеза *ab initio* ДНК-полимеразой Bst в присутствии никазы Nt.BspD6I при добавлении в реакционную смесь белков T4 gp32 и SSB *E. coli* [49]. Оказалось, что эти два функционально сходных белка имеют различное влияние на синтез *ab initio*: T4 gp32 полностью его ингибирует, а SSB *E. coli* – нет. Эффект объяснили различной пространственной организацией формируемых комплексов этих белков с одноцепочечной ДНК. С другой стороны, T4 gp32 и SSB *E. coli* успешно применяли в реакциях NDA (никаза-зависимая изотермическая ДНК-амплификация, nickase-dependent isothermal DNA amplification) и LSDA (амплификация с замещением цепи в «линейном» режиме, linear strand displacement amplification) для подавления неспецифического синтеза, в том числе и вызванного синтезом *ab initio* [38, 50]. Вероятнее всего, в реакции LSDA белок SSB *E. coli* функционировал в комбинации с очень точной и процессивной секвеназой 2.0 (модифицированная T7 ДНК-полимераза) и никазой Nt.BspQI, узнающей 7-звенную последовательность в ДНК. Применение такой комбинации позволило решить проблему ограничения длины и получить целевые дискретные продукты реакции размером до нескольких тысяч п.н. [38]. Появление неспецифических продуктов синтеза ДНК *ab initio* в поздней фазе амплификации EXPAR предложили попросту игнорировать, поскольку синтез целевых олигонуклеотидных продуктов происходит в течение 10 мин, тогда как максимальное количество продуктов безматричного синтеза образуется в течение 0,5–1 ч [46]. Urtel et al. увидели решение проблемы в проведении реакции без dATP в смеси при использовании никаз Nb.BssSI, Nt.BsmAI и Nt.BspQI, имеющих сайты узнавания, содержащие последовательности из только трех нуклеотидов (dC, dG, dT) в «верхней» цепи (рис. 3) [52]. Для реакции конструировали олигонуклеотид-триггер только из dC, dG и dT и

матрицу, содержащую лишь dC, dG и dA в своей последовательности. В отсутствие dATP изотермическая амплификация с матрицы протекала эффективно, тогда как синтез *ab initio* был ингибирован. Ингибирование происходило за счет затруднения синтеза неспецифических продуктов со шпильчатыми структурами, а также за счет невозможности расщепления неспецифических продуктов никазой (отсутствие сайта никазы в их последовательности).

ОСОБЕННОСТИ ДНК-ПОЛИМЕРАЗ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ОБРАЗОВАНИЕ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ПРОДУКТОВ

При обсуждении образования неспецифических продуктов амплификации отмечается важная роль используемых ДНК-полимераз, поскольку каждая обладает своим собственным набором каталитических и других функциональных активностей. Синтез неспецифических продуктов объясняют проявлением дополнительных активностей определенной ДНК-полимеразы, используемой в методе. ДНК-полимеразы, помимо основных свойств (полимеразной и экзонуклеазной активностей), могут дополнительно обладать активностями обратной транскриптазы (RT) и терминальной дезоксинуклеотидилтрансферазы (TdT) [62]. Примерами полимераз, обладающих этими двумя активностями, могут служить фрагмент Кленова полимеразы I *E. coli* и ДНК-полимераза Bst [63]. Недавно было продемонстрировано, что и ДНК-полимераза phi29 обладает ограниченной активностью обратной транскриптазы [64]. Эта полимеразы амплифицировала кольцевые ДНК-матрицы с небольшим количеством «рассеянных» по последовательности рибонуклеозидтрифосфатов (rNTPs) в реакциях RCA с такой же эффективностью, как и обычные. Однако в случае увеличения количества rNTPs в последовательности ДНК-матрицы выход продукта реакции заметно снижался. Добавление полимеразой одного или более нуклеотидов (как правило, dATP) на «тупые» 3'-концы ДНК-дуплекса за счет активности TdT независимо от матрицы вызывает нежелательное образование выступающих концов и может инициировать появление неспецифических продуктов. Возможность перехода с одной матрицы на другую и образования нового более длинного продукта за счет активности TdT показана в экспериментах с фрагментом Кленова [65]. В недавнем исследовании Que et al. использовали TdT для синтеза длинной последовательности поли-А на 3'-конце детектируемой ДНК. В свою оче-

редь, эта последовательность поли-А выполняла роль праймера в реакции RCA [66]. Активностью RT, т.е. способностью использовать РНК в качестве матрицы для синтеза ДНК, и условиями, в которых она проявляется, часто пренебрегают. Эта активность может служить причиной неспецифического синтеза ДНК с примесной экзогенной РНК и снижения точности полимеразы. В итоге одновременное наличие активности TdT, RT, способности выполнять синтез *ab initio*, а также отсутствие 5'→3' и 3'→5' экзонуклеазной активности позволяет некоторым ДНК-полимеразам, в частности Bst, инициировать реакции образования неспецифических продуктов [31, 53].

Необходимыми, в первую очередь для изотермической амплификации, функциональными свойствами ДНК-полимераз являются процессивность и способность к вытеснению цепи, однако именно эти активности позволяют полимеразам успешно амплифицировать и нежелательные конструкции. Источником проблем амплификации может выступать конфликт функциональных свойств ДНК-полимеразы [62]. Например, 3'→5' экзонуклеазная активность повышает точность амплификации, однако может приводить к снижению выходу продукта и деградации праймеров. Полимеразы, которые позволяют получать высокий выход продукта, имеют меньшую точность, что приводит к появлению большего числа неканонических пар нуклеотидов в целевом продукте. Разрабатывая или адаптируя метод изотермической амплификации для конкретной задачи и выбирая при этом ДНК-полимеразу, необходимо учитывать подобные факты.

Заслуживает внимания и давно известная проблема образования неспецифических продуктов на ДНК-матрицах, содержащих тракты (A)_n, прямые или инвертированные повторы, в т.ч. палиндромные или квазипалиндромные последовательности, формирующие альтернативные структуры ДНК [67]. Показано, как ДНК-полимеразы с лучшей процессивностью успешно преодолевают такие структуры, а другие, менее процессивные, диссоциируют от матрицы и образуют укороченные продукты реакции [68, 69]. Тем не менее проблема «сложных» матриц остается актуальной и для высокопроцессивных ДНК-полимераз. Очевидно, что помимо выбора ДНК-полимераз с лучшей процессивностью и более высокой способностью к замещению цепи, избавиться от нежелательных продуктов реакции в значительной степени позволяет оптимизация условий реакции, в т.ч. повышение температуры и применение белков SSB. Так или иначе, необходимо из-

бегать ситуаций, в которых функционирование ДНК-полимеразы может быть некорректным и выражаться в проявлении дополнительных активностей в большей степени, в ущерб основным.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изотермические методы амплификации имеют большой потенциал для проведения анализов в местах оказания медицинской помощи или в «полевых» условиях, поскольку не требуют сложного оборудования и высокой квалификации персонала. Для успешного внедрения изотермической амплификации в широкую практику проблема синтеза неспецифических продуктов требует особого осмысления и отдельного изучения для каждого метода. Суммируя рассмотренные данные, можно предположить, что сам механизм того или иного метода изотермической амплификации нуклеиновых кислот наряду с условиями реакции может диктовать основную причину неспецифической амплификации. Возникновение неспецифических продуктов обуславливается совокупностью целого ряда причин. В их числе можно рассматривать все комбинации нежелательных взаимодействий праймеров, способствующих дальнейшей амплификации (образование димеров праймеров и шпилечных структур), а также неспецифическую гибридизацию праймера с матрицей или тотальной ДНК, присутствующей в образце. Появление сильного фона, мешающего различить целевую последовательность, можно объяснить неканоническим синтезом ДНК *ab initio*, а также способностью ДНК-полимеразы за счет своих дополнительных активностей инициировать «артефактный» синтез на матрице.

На пути к улучшению изотермических систем амплификации, в частности, устранению неспецифических продуктов реакции, исследователи двигаются в разных направлениях, но одним из самых перспективных является работа с ДНК-полимеразой. Корректировать работу ДНК-полимераз можно путем оптимизации условий их функционирования в ходе реакции (варьирование количества и набора dNTPs, ионной силы раствора, pH), а также изучения их функционирования в условиях макромолекулярного краудинга (т.е. в условиях повышенной концентрации молекул и уменьшения степеней свободы диффузии молекул белков от ДНК) [62, 70–72]. Поиск новых природных ДНК-полимераз и улучшение их активностей генно-инженерными методами даст возможность более

гибко подбирать условия проведения реакции [73]. Получение ДНК-полимераз с повышенной термостабильностью позволяет повышать температуру реакции для более точной гибридизации праймеров [74]. Использование полимераз с повышенным сродством к ДНК, возможно, будет способствовать снижению количества неспецифических продуктов [75]. Также в решении проблемы неспецифического синтеза в реакциях изотермической амплификации может помочь устранение способности ферментов к обратной транскрипции и повышение точности

ДНК-полимераз с функцией замещения цепи [31].

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания № 075-00845-20-01.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Craw, P., and Balachandran, W. (2012) Isothermal nucleic acid amplification technologies for point-of-care diagnostics: a critical review, *Lab Chip*, **12**, 2469-2486, doi: 10.1039/c2lc40100b.
2. Gill, P., and Ghaemi, A. (2008) Nucleic acid isothermal amplification technologies: a review, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **27**, 224-243, doi: 10.1080/15257770701845204.
3. Niemz, A., Ferguson, T. M., and Boyle, D. S. (2011) Point-of-care nucleic acid testing for infectious diseases, *Trends Biotechnol.*, **29**, 240-250, doi: 10.1016/j.tibtech.2011.01.007.
4. Obande, G. A., and Banga Singh, K. K. (2020) Current and future perspectives on isothermal nucleic acid amplification technologies for diagnosing infections, *Infect. Drug Resist.*, **13**, 455-483, doi: 10.2147/IDR.S217571.
5. 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.
6. Bodulev, O. L., and Sakharov, I. Y. (2020) Isothermal nucleic acid amplification techniques and their use in bioanalysis, *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 147-166, doi: 10.1134/S0006297920020030.
7. Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., et al. (2000) Loop-mediated isothermal amplification of DNA, *Nucleic Acids Res.*, **28**, E63, doi: 10.1093/nar/28.12.e63.
8. Rolando, J. C., Jue, E., Barlow, J. T., and Ismagilov, R. F. (2020) Real-time kinetics and high-resolution melt curves in single-molecule digital LAMP to differentiate and study specific and non-specific amplification, *Nucleic Acids Res.*, **48**, e42-e42, doi: 10.1093/nar/gkaa099.
9. Schneider, L., Blakely, H., and Tripathi, A. (2019) Mathematical model to reduce loop mediated isothermal amplification (LAMP) false-positive diagnosis, *Electrophoresis*, **40**, 2706-2717, doi: 10.1002/elps.201900167.
10. 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.
11. Piepenburg, O., Williams, C. H., Stemple, D. L., and Armes, N. A. (2006) DNA detection using recombination proteins, *PLoS Biol.*, **4**, e204, doi: 10.1371/journal.pbio.0040204.
12. Sharma, N., Hoshika, S., Hutter, D., Bradley, K. M., and Benner, S. A. (2014) Recombinase-based isothermal amplification of nucleic acids with self-avoiding molecular recognition systems (SAMRS), *ChemBioChem*, **15**, 2268-2274, doi: 10.1002/cbic.201402250.
13. 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.
14. 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.
15. James, A., and Macdonald, J. (2015) Recombinase polymerase amplification: Emergence as a critical molecular technology for rapid, low-resource diagnostics, *Expert Rev. Mol. Diagn.*, **15**, 1475-1489, doi: 10.1586/14737159.2015.1090877.
16. Higgins, M., Ravenhall, M., Ward, D., Phelan, J., Ibrahim, A., et al. (2018) PrimedRPA: primer design for recombinase polymerase amplification assays, *Bioinformatics*, **35**, 682-684, doi: 10.1093/bioinformatics/bty701.
17. Rohrman, B., and Richards-Kortum, R. (2015) Inhibition of recombinase polymerase amplification by background DNA: a lateral flow-based method for enriching target DNA, *Anal. Chem.*, **87**, 1963-1967, doi: 10.1021/ac504365v.
18. Compton, J. (1991) Nucleic acid sequence-based amplification, *Nature*, **350**, 91-92, doi: 10.1038/350091a0.
19. Kievits, T., van Gemen, B., van Strijp, D., Schukkink, R., Dircks, M., et al. (1991) NASBA™ isothermal enzymatic *in vitro* nucleic acid amplification optimized for the diagnosis of HIV-1 infection, *J. Virol. Methods*, **35**, 273-286, doi: 10.1016/0166-0934(91)90069-C.
20. Morabito, K., Wiske, C., and Tripathi, C. W. A. (2013) Engineering insights for multiplexed real-time nucleic acid sequence-based amplification (NASBA): implications for design of point-of-care diagnostics, *Mol. Diagn. Ther.*, **17**, 185-192, doi: 10.1007/s40291-013-0029-4.
21. Markham, N. R., and Zuker, M. (2005) DINAMelt web server for nucleic acid melting prediction, *Nucleic Acids Res.*, **33**, W577-W581, doi: 10.1093/nar/gki591.
22. Heim, A., Grumbach, I. M., Zeuke, S., and Top, B. (1998) Highly sensitive detection of gene expression of an intronless gene: amplification of mRNA, but not genomic DNA by nucleic acid sequence based amplification (NASBA), *Nucleic Acids Res.*, **26**, 2250-2251, doi: 10.1093/nar/26.9.2250.
23. Polstra, A. M., Goudsmit, J., and Cornelissen, M. (2002) Development of real-time NASBA assays with molecular beacon detection to quantify mRNA coding for HHV-8 lytic and latent genes, *BMC Infect. Dis.*, **2**, 18, doi: 10.1186/1471-2334-2-18.
24. 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.
25. Lizardi, P. M., Huang, X., Zhu, Z., Bray-Ward, P., Thomas, D. C., and Ward, D. C. (1998) Mutation detec-

- tion and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification, *Nat. Genet.*, **19**, 225-232, doi: 10.1038/898.
26. Dean, F. B., Nelson, J. R., Giesler, T. L., and Lasken, R. S. (2001) Rapid amplification of plasmid and phage DNA using Phi 29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification, *Genome Res.*, **11**, 1095-1099, doi: 10.1101/gr.180501.
 27. Dean, F. B., Hosono, S., Fang, L., Wu, X., Faruqi, A. F., et al. (2002) Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 5261, doi: 10.1073/pnas.082089499.
 28. Brukner, I., Paquin, B., Belouchi, M., Labuda, D., and Krajcinovic, M. (2005) Self-priming arrest by modified random oligonucleotides facilitates the quality control of whole genome amplification, *Anal. Biochem.*, **339**, 345-347, doi: 10.1016/j.ab.2005.01.005.
 29. Murakami, T., Sumaoka, J., and Komiyama, M. (2008) Sensitive isothermal detection of nucleic-acid sequence by primer generation – rolling circle amplification, *Nucleic Acids Res.*, **37**, e19-e19, doi: 10.1093/nar/gkn1014.
 30. Garafutdinov, R. R., Gilvanov, A. R., and Sakhabutdinova, A. R. (2020) The influence of reaction conditions on DNA multimerization during isothermal amplification with Bst exo- DNA polymerase, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **190**, 758-771, doi: 10.1007/s12010-019-03127-6.
 31. Wang, G., Ding, X., Hu, J., Wu, W., Sun, J., and Mu, Y. (2017) Unusual isothermal multimerization and amplification by the strand-displacing DNA polymerases with reverse transcription activities, *Sci. Rep.*, **7**, 017-13324, doi: 10.1038/s41598-017-13324-0.
 32. Garafutdinov, R. R., Sakhabutdinova, A. R., Kupryushkin, M. S., and Pyshnyi, D. V. (2020) Prevention of DNA multimerization using phosphoryl guanidine primers during isothermal amplification with Bst exo-DNA polymerase, *Biochimie*, **168**, 259-267, doi: 10.1016/j.biochi.2019.11.013.
 33. Inoue, J., Shigemori, Y., and Mikawa, T. (2006) Improvements of rolling circle amplification (RCA) efficiency and accuracy using *Thermus thermophilus* SSB mutant protein, *Nucleic Acids Res.*, **34**, e69-e69, doi: 10.1093/nar/gk1350.
 34. Mikawa, T., Inoue, J., and Shigemori, Y. (2009) Single-stranded DNA binding protein facilitates specific enrichment of circular DNA molecules using rolling circle amplification, *Anal. Biochem.*, **391**, 81-84, doi: 10.1016/j.ab.2009.05.013.
 35. Walker, G. T., Little, M. C., Nadeau, J. G., and Shank, D. D. (1992) Isothermal *in vitro* amplification of DNA by a restriction enzyme/DNA polymerase system, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 392-396, doi: 10.1073/pnas.89.1.392.
 36. Chan, S.-H., Zhu, Z., Van Etten, J. L., and Xu, S.-Y. (2004) Cloning of CviPII nicking and modification system from *Chlorella virus* NYs-1 and application of Nt. CviPII in random DNA amplification, *Nucleic Acids Res.*, **32**, 6187-6199, doi: 10.1093/nar/gkh958.
 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, doi: 10.1073/pnas.0730811100.
 38. Joneja, A., and Huang, X. (2011) Linear nicking endonuclease-mediated strand-displacement DNA amplification, *Anal. Biochem.*, **414**, 58-69, doi: 10.1016/j.ab.2011.02.025.
 39. Zhou, H., Xie, S.-J., Zhang, S.-B., Shen, G.-L., Yu, R.-Q., and Wu, Z.-S. (2013) Isothermal amplification system based on template-dependent extension, *Chem. Commun.*, **49**, 2448-2450, doi: 10.1039/c3cc38358j.
 40. Shi, C., Liu, Q., Zhou, M., Zhao, H., Yang, T., and Ma, C. (2016) Nicking endonuclease-mediated isothermal exponential amplification for double-stranded DNA detection, *Sens. Actuat. B. Chem.*, **222**, 221-225, doi: 10.1016/j.snb.2015.08.060.
 41. Абросимова Л. А., Кисиль О. В., Романова Е. А., Орецкая Т. С., Кубарева Е. А. (2019) Никующие эндонуклеазы как уникальные инструменты в биотехнологии и генетической инженерии, *Биоорганическая химия*, **445**, 451-471, doi: 10.1134/S0132342319050014.
 42. 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.
 43. Spargo, C. A., Fraiser, M. S., Van Cleve, M., Wright, D. J., Nycz, C. M., et al. (1996) Detection of *M. tuberculosis* DNA using thermophilic strand displacement amplification, *Mol. Cell. Probes*, **10**, 247-256, doi: 10.1006/mcpr.1996.0034.
 44. Nadeau, J. G., Pitner, J. B., Linn, C. P., Schram, J. L., Dean, C. H., and Nycz, C. M. (1999) Real-time, sequence-specific detection of nucleic acids during strand displacement amplification, *Anal. Biochem.*, **276**, 177-187, doi: 10.1006/abio.1999.4350.
 45. Ehses, S., Ackermann, J., and McCaskill, J. S. (2005) Optimization and design of oligonucleotide setup for strand displacement amplification, *J. Biochem. Biophys. Methods*, **63**, 170-186, doi: 10.1016/j.jbbm.2005.04.005.
 46. Tan, E., Erwin, B., Dames, S., Ferguson, T., Buechel, M., et al. (2008) Specific versus nonspecific isothermal DNA amplification through thermophilic polymerase and nicking enzyme activities, *Biochemistry*, **47**, 9987-9999, doi: 10.1021/bi800746p.
 47. Reid, M. S., Paliwoda, R. E., Zhang, H., and Le, X. C. (2018) Reduction of background generated from template-template hybridizations in the exponential amplification reaction, *Anal. Chem.*, **90**, 11033-11039, doi: 10.1021/acs.analchem.8b02788.
 48. Little, M. C., Andrews, J., Moore, R., Bustos, S., Jones, L., et al. (1999) Strand displacement amplification and homogeneous real-time detection incorporated in a second-generation DNA probe system, BDPProbeTecET, *Clin. Chem.*, **45**, 777-784, doi: 10.1093/clinchem/45.6.777.
 49. Зырина Н. В., Артюх Р. И., Свальбина И. В., Железная Л. А., Матвиенко Н. И. (2012) Влияние белков, связывающихся с одноцепочечной ДНК, на безматричный/беспраймерный синтез ДНК в присутствии никующей эндонуклеазы Nt.BspD6I, *Биоорганическая химия*, **38**, 199-205, doi: 10.1134/S1068162012020161.
 50. He, Y., and Jiang, T. (2013) Nickase-dependent isothermal DNA amplification, *Adv. Biosci. Biotechnol.*, **4**, 539-542, doi: 10.4236/abb.2013.44070.
 51. Menova, P., Raindlova, V., and Hocek, M. (2013) Scope and limitations of the nicking enzyme amplification reaction for the synthesis of base-modified oligonucleotides and primers for PCR, *Bioconj. Chem.*, **24**, 1081-1093, doi: 10.1021/bc400149q.
 52. Urtel, G., Van Der Hofstadt, M., Galas, J.-C., and Estevez-Torres, A. (2019) rEXPAR: an isothermal amplification scheme that is robust to autocatalytic parasites, *Biochemistry*, **58**, 2675-2681, doi: 10.1021/acs.biochem.9b00063.
 53. Zyrina, N. V., Antipova, V. N., and Zheleznyaya, L. A. (2014) *Ab initio* synthesis by DNA polymerases, *FEMS Microbiol. Lett.*, **351**, 1-6, doi: 10.1111/1574-6968.12326.
 54. Liang, X., Jensen, K., and Frank-Kamenetskii, M. D. (2004) Very efficient template/primer-independent DNA synthesis by thermophilic DNA polymerase in the presence of a thermophilic restriction endonuclease, *Biochemistry*, **43**, 13459-13466, doi: 10.1021/bi0489614.

55. Zyrina, N. V., Zheleznyaya, L. A., Dvoretzky, E. V., Vasiliev, V. D., Chernov, A., and Matvienko, N. I. (2007) N.BspD6I DNA nickase strongly stimulates template-independent synthesis of non-palindromic repetitive DNA by Bst DNA polymerase, *Biol. Chem.*, **388**, 367-372, doi: 10.1515/BC.2007.043.
56. Antipova, V. N., Zheleznyaya, L. A., and Zyrina, N. V. (2014) *Ab initio* DNA synthesis by Bst polymerase in the presence of nicking endonucleases Nt.AlwI, Nb.BbvCI, and Nb.BsmI, *FEMS Microbiol. Lett.*, **357**, 144-150, doi: 10.1111/1574-6968.12511.
57. Kaboev, O. K., and Luchkina, L. A. (2004) Template-free primer-independent DNA synthesis by bacterial DNA polymerases I using the DnaB protein from *Escherichia coli*, *Dokl. Biochem. Biophys.*, **398**, 265-267, doi: 10.1023/b:dobi.0000046633.66624.58.
58. Beguin, P., Gill, S., Charpin, N., and Forterre, P. (2015) Synergistic template-free synthesis of dsDNA by *Thermococcus nautilli* primase PolpTN2, DNA polymerase PolB, and pTN2 helicase, *Extremophiles*, **19**, 69-76, doi: 10.1007/s00792-014-0706-1.
59. Schachman, H. K., Adler, J., Radding, C. M., Lehman, I. R., and Kornberg, A. (1960) Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. VII. Synthesis of a polymer of deoxyadenylate and deoxythymidylate, *J. Biol. Chem.*, **235**, 3242-3249.
60. Ogata, N., and Miura, T. (1997) Genetic information "created" by archaeobacterial DNA polymerase, *Biochem. J.*, **324 (Pt 2)**, 667-671, doi: 10.1042/bj3240667.
61. Ogata, N., and Miura, T. (1998) Creation of genetic information by DNA polymerase of the thermophilic bacterium *Thermus thermophilus*, *Nucleic Acids Res.*, **26**, 4657-4661, doi: 10.1093/nar/26.20.4657.
62. Pavlov, A. R., Pavlova, N. V., Kozyavkin, S. A., and Slesarev, A. I. (2004) Recent developments in the optimization of thermostable DNA polymerases for efficient applications, *Trends Biotechnol.*, **22**, 253-260, doi: 10.1016/j.tibtech.2004.02.011.
63. Shi, C., Shen, X., Niu, S., and Ma, C. (2015) Innate reverse transcriptase activity of DNA polymerase for isothermal RNA direct detection, *J. Am. Chem. Soc.*, **137**, 13804-13806, doi: 10.1021/jacs.5b08144.
64. Krzywkowski, T., Kühnemund, M., Wu, D., and Nilsson, M. (2018) Limited reverse transcriptase activity of phi29 DNA polymerase, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 3625-3632, doi: 10.1093/nar/gky190.
65. Garcia, P. B., Robledo, N. L., and Islas, A. L. (2004) Analysis of non-template-directed nucleotide addition and template switching by DNA polymerase, *Biochemistry*, **43**, 16515-16524, doi: 10.1021/bi0491853.
66. Que, H., Yan, X., Guo, B., Ma, H., Wang, T., et al. (2019) Terminal deoxynucleotidyl transferase and rolling circle amplification induced G-triplex formation: a label-free fluorescent strategy for DNA methyltransferase activity assay, *Sens. Actuat. B Chem.*, **291**, 394-400, doi: 10.1016/j.snb.2019.04.091.
67. Sinden, R. R., Potaman, V. N., Oussatcheva, E. A., Pearson, C. E., Lyubchenko, Y. L., and Shlyakhtenko, L. S. (2002) Triplet repeat DNA structures and human genetic disease: dynamic mutations from dynamic DNA, *J. Biosci.*, **27**, 53-65, doi: 10.1007/BF02703683.
68. Canceill, D., Viguera, E., and Ehrlich, S. D. (1999) Replication slippage of different DNA polymerases is inversely related to their strand displacement efficiency, *J. Biol. Chem.*, **274**, 27481-27490, doi: 10.1074/jbc.274.39.27481.
69. Viguera, E., Canceill, D., and Ehrlich, S. D. (2001) Replication slippage involves DNA polymerase pausing and dissociation, *EMBO J.*, **20**, 2587-2595, doi: 10.1093/emboj/20.10.2587.
70. Akabayov, B., Akabayov, S. R., Lee, S. J., Wagner, G., and Richardson, C. C. (2013) Impact of macromolecular crowding on DNA replication, *Nat. Commun.*, **4**, 1615, doi: 10.1038/ncomms2620.
71. Tong, Y., Lemieux, B., and Kong, H. (2011) Multiple strategies to improve sensitivity, speed and robustness of isothermal nucleic acid amplification for rapid pathogen detection, *BMC Biotechnol.*, **11**, 1472-6750, doi: 10.1186/1472-6750-11-50.
72. Garafutdinov, R. R., Gilvanov, A. R., Kupova, O. Y., and Sakhabutdinova, A. R. (2020) Effect of metal ions on isothermal amplification with Bst exo-DNA polymerase, *Int. J. Biol. Macromol.*, **161**, 1447-1455, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.08.028.
73. Piotrowski, Y., Gurung, M. K., and Larsen, A. N. (2019) Characterization and engineering of a DNA polymerase reveals a single amino-acid substitution in the fingers subdomain to increase strand-displacement activity of A-family prokaryotic DNA polymerases, *BMC Mol. Cell. Biol.*, **20**, 31, doi: 10.1186/s12860-019-0216-1.
74. Milligan, J. N., Shroff, R., Garry, D. J., and Ellington, A. D. (2018) Evolution of a thermophilic strand-displacing polymerase using high-temperature isothermal compartmentalized self-replication, *Biochemistry*, **57**, 4607-4619, doi: 10.1021/acs.biochem.8b00200.
75. Oscorbin, I. P., Belousova, E. A., Boyarskikh, U. A., Zakabunin, A. I., Khrapov, E. A., and Filipenko, M. L. (2017) Derivatives of Bst-like Gss-polymerase with improved processivity and inhibitor tolerance, *Nucleic Acids Res.*, **45**, 9595-9610, doi: 10.1093/nar/gkx645.

NONSPECIFIC SYNTHESIS IN THE REACTIONS OF ISOTHERMAL NUCLEIC ACID AMPLIFICATION

Review

N. V. Zyrina^{1,2} and V. N. Antipova^{2*}

¹ Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, 142290 Pushchino, Moscow Region, Russia

² Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, 142290 Pushchino, Moscow Region, Russia; E-mail: valery_a@rambler.ru

The review focuses on the main causes of nonspecific products synthesis in the course of isothermal nucleic acid amplification as a result of wide range of factors: mispriming with a subsequent amplification, *ab initio* DNA synthesis and additional activities of DNA polymerases. The approaches being developed to eliminate nonspecific products are discussed in LAMP, RPA, NASBA, RCA, SDA, LSDA, NDA and EXPAR reactions.

Keywords: isothermal amplification, background synthesis, DNA polymerases, LAMP, SDA, EXPAR