



УДК 577.29

EDN JHPLPY

<https://doi.org/10.33910/2687-1270-2023-4-3-324-334>

Полногеномная амплификация малых количеств ДНК для определения молекулярного кариотипа клеток

А. Ф. Сайфитдинова ^{✉1,2}, О. А. Павлова ^{2,3}, А. А. Зелинский ⁴, М. В. Рябина ⁴,
О. С. Глотов ^{5,6,7}, Д. И. Богомаз ^{3,8}, А. А. Рубель ⁴

¹ Российский государственный педагогический университет им. А. И. Герцена, 191186, Россия, г. Санкт-Петербург, наб. р. Мойки, д. 48

² Международный центр репродуктивной медицины, 197350, Россия, г. Санкт-Петербург, Комендантский пр., д. 53, к. 1, лит. А

³ ООО «Бигль», 192289, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Бухарестская, д. 152, к. 1, кв. 1–77

⁴ Санкт-Петербургский государственный университет, 199034, Россия, г. Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7–9

⁵ Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства России, 197022, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 9

⁶ ООО «Сербалаб», 199106, Россия, г. Санкт-Петербург, Большой пр. В. О., д. 90, к. 2, лит. 3

⁷ Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д. О. Отта, 199034, Россия, г. Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д. 3

⁸ Институт биомедицинских систем и биотехнологии Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого, 194021, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Хлопина, д. 11

Сведения об авторах

Алсу Фаритовна Сайфитдинова, SPIN-код: 5114-4844, Scopus AuthorID: 6603195889, ResearcherID: C-1104-2011, ORCID: 0000-0002-1221-479X, e-mail: saifitdinova@mail.ru

Ольга Андреевна Павлова, ORCID: 0000-0001-9488-6903, e-mail: pavlova@biobeagle.com

Андрей Андреевич Зелинский, ORCID: 0000-0003-2068-3024, e-mail: andrew_zelinsky@mail.ru

Марина Владиславовна Рябина, ORCID: 0000-0002-5504-7362, e-mail: st070667@student.spbu.ru

Олег Сергеевич Глотов, SPIN-код: 4531-3449, Scopus AuthorID: 23988449900, ResearcherID: H-2516-2017, ORCID: 0000-0002-0091-2224, e-mail: olglotov@mail.ru

Денис Игоревич Богомаз, ORCID: 0000-0002-6536-3465, e-mail: bogomazden@mail.ru

Александр Анатольевич Рубель, SPIN-код: 3961-4690, Scopus AuthorID: 23981106300, ResearcherID: D-2903-2013, ORCID: 0000-0001-6203-2006, e-mail: arubel@mail.ru

Для цитирования: Сайфитдинова, А. Ф., Павлова, О. А., Зелинский, А. А., Рябина, М. В., Глотов, О. С., Богомаз, Д. И., Рубель, А. А. (2023) Полногеномная амплификация малых количеств ДНК для определения молекулярного кариотипа клеток. *Интегративная физиология*, т. 4, № 3, с. 324–334. <https://doi.org/10.33910/2687-1270-2023-4-3-324-334> EDN JHPLPY

Получена 4 июля 2023; прошла рецензирование 26 августа 2023; принята 1 сентября 2023.

Финансирование: Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 20-14-00148.

Права: © А. Ф. Сайфитдинова, О. А. Павлова, А. А. Зелинский, М. В. Рябина, О. С. Глотов, Д. И. Богомаз, А. А. Рубель (2023). Опубликовано Российским государственным педагогическим университетом им. А. И. Герцена. Открытый доступ на условиях лицензии CC BY-NC 4.0.

Аннотация. Задача равномерного масштабирования предельно малых количеств ДНК из отдельных клеток для молекулярно-генетических исследований потребовала разработки специализированных методов. За 30 лет были предложены разные подходы, базирующиеся на использовании вырожденных праймеров. Однако ограничение методов определяется также свойствами используемых полимераз. В настоящем исследовании предложено использование двухступенчатой полногеномной амплификации для получения надежных данных о молекулярном кариотипе исходного образца на основе анализа 20 пикограммов (пг) ДНК. В протоколе на первом этапе фланкирования фрагментов ДНК и амплификации с вытеснением второй цепи была использована пара частично вырожденных праймеров: 5'-TGTGTTGGGTGTGTTTGGNNNNNNGG и 5'-TGTGTTGGGTGTGTTTGGNNNNNNNTTT,

а на втором этапе полимеразной цепной реакции ограничились использованием праймера на основе конститутивной части 5'-TGTTGGGTGTGTTGG. В работе приведены условия реакции и сравнение использования различных полимераз, а также их сочетаний. Показана возможность применения для первого этапа комбинации полимераз Bst и Pfu в присутствии 10 мМ ионов магния, а также выявлен потенциал для использования полимеразы KlenTaq1, несущей замену D732N, для развития методов полногеномной амплификации. Продемонстрировано, что предложенный метод позволяет масштабировать исходное предельно малое количество ДНК для получения образца, пригодного для анализа методом массового параллельного секвенирования (секвенирование нового поколения, *next generation sequencing*, NGS) с применением стандартных коммерческих протоколов интерпретации данных.

Ключевые слова: вырожденные праймеры, амплификация с множественным вытеснением цепи, полимеразная цепная реакция (ПЦР), секвенирование ДНК отдельных клеток, изменение числа копий участков генома, молекулярный кариотип

Whole genome amplification of small amounts of DNA to determine the molecular karyotype of cells

A. F. Saifitdinova^{1,2}, O. A. Pavlova^{2,3}, A. A. Zelinsky⁴, M. V. Ryabinina⁴,
O. S. Glotov^{5,6,7}, D. I. Bogomaz^{3,8}, A. A. Rubel⁴

¹ Herzen State Pedagogical University of Russia, 48 Moika Emb., Saint Petersburg 191186, Russia

² International Centre for Reproductive Medicine, 53 Komendantsky Ave., Bld. 1A, Saint Petersburg 197350, Russia

³ Beagle LTD, 152 Bukharestskaya Str., Bld. 1-77, Saint Petersburg 192289, Russia

⁴ Saint Petersburg State University, 7–9 Universitetskaya Emb., Saint Petersburg 199034, Russia

⁵ Children's Scientific and Clinical Center for Infectious Diseases of the Federal Medical and Biological Agency of Russia, 9 Professora Popova Str., Saint Petersburg 197022, Russia

⁶ Serbalab, 90 Bolshoy Ave. V. O., Saint Petersburg 199106, Russia

⁷ Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology named after D. O. Ott, 3 Mendeleevskaya Line, Saint Petersburg 199034, Russia

⁸ Institute of Biomedical Systems and Biotechnology, Peter the Great Saint Petersburg Polytechnic University, 11 Khlopina Str., Saint Petersburg 194021, Russia

Authors

Alsu F. Saifitdinova, SPIN: 5114-4844, Scopus AuthorID: 6603195889, ResearcherID: C-1104-2011, ORCID: 0000-0002-1221-479X, e-mail: saifitdinova@mail.ru

Olga A. Pavlova, ORCID: 0000-0001-9488-6903, e-mail: pavlova@biobeagle.com

Andrew A. Zelinsky, ORCID: 0000-0003-2068-3024, e-mail: andrew_zelinsky@mail.ru

Marina V. Ryabinina, ORCID: 0000-0002-5504-7362, e-mail: st070667@student.spbu.ru

Oleg S. Glotov, SPIN: 4531-3449, Scopus AuthorID: 23988449900, ResearcherID: H-2516-2017, ORCID: 0000-0002-0091-2224, e-mail: olglotov@mail.ru

Denis I. Bogomaz, ORCID: 0000-0002-6536-3465, e-mail: bogomazden@mail.ru

Aleksandr A. Rubel, SPIN: 3961-4690, Scopus AuthorID: 23981106300, ResearcherID: D-2903-2013, ORCID: 0000-0001-6203-2006, e-mail: arubel@mail.ru

For citation: Saifitdinova, A. F., Pavlova, O. A., Zelinsky, A. A., Ryabinina, M. V., Glotov, O. S., Bogomaz, D. I., Rubel, A. A. (2023) Whole genome amplification of small amounts of DNA to determine the molecular karyotype of cells. *Integrative Physiology*, vol. 4, no. 3, pp. 324–334. <https://doi.org/10.33910/2687-1270-2023-4-3-324-334> EDN JHPLPY

Received 4 July 2023; reviewed 26 August 2023; accepted 1 September 2023.

Funding: This work was supported by the Russian Science Foundation, grant No. 20-14-00148.

Copyright: © A. F. Saifitdinova, O. A. Pavlova, A. A. Zelinsky, M. V. Ryabinina, O. S. Glotov, D. I. Bogomaz, A. A. Rubel (2023). Published by Herzen State Pedagogical University of Russia. Open access under CC BY-NC License 4.0.

Abstract. Molecular genetic studies often face the need to perform uniform scaling of extremely small amounts of DNA from single cells. This, however, requires the development of specialized methods. Over the past 30 years, various approaches based on the use of degenerate primers have been proposed. However, the methods are not devoid of limitations. These limitations, among other things, are determined by the properties of polymerases. In the present study, we propose the use of two-step whole genome amplification to obtain reliable data on the molecular karyotype of the original sample based on the analysis of 20 picograms of DNA. In the protocol, at the first stage of DNA fragment flanking and amplification with the displacement

of the second strand, a pair of partially degenerate primers was used: 5'-TGTGTTGGGTGTGTTTGGNNNNNNNGG and 5'-TGTGTTGGGTGTGTTTGGNNNNNNNTTT. At the second stage of the polymerase chain reaction, the use of a primer based on the constitutive part is sufficient: 5'-TGTGTTGGGTGTGTTTGG. The article provides reaction conditions and compares the use of various polymerases and their combinations. It discusses the possibility of using a blend of Bst and Pfu polymerases in the presence of 10 mM magnesium ions for the first stage. It also shows the potential for using KlenTaq1 polymerase carrying the D732N substitution for the development of whole genome amplification methods. It has been demonstrated that the proposed method allows scaling the initial extremely small amount of DNA to obtain a sample suitable for analysis by massive parallel sequencing (next generation sequencing, NGS) using standard commercial data interpretation protocols.

Keywords: degenerate primers, multiple-strand displacement amplification (MDA), polymerase chain reaction (PCR), single cell DNA sequencing, copy number variation (CNV), molecular karyotype

Введение

Методы полногеномной амплификации ДНК (*whole genome amplification*, WGA) начали разрабатывать для использования в проектах геномных исследований с конца XX века. Они были направлены в первую очередь на получение надежного метода масштабирования малых количеств ДНК без использования трудоемких и дорогостоящих методов клонирования, которые не гарантировали точность, а также могли приводить к утрате отдельных элементов наследственной информации. Однако ограниченные возможности известных ферментов и незнание принципов организации геномов ограничивали возможности ученых.

Метод амплификации ДНК *in vitro* начал развиваться с использования описанной в 1970 году большой субъединицы ДНК-полимеразы I из *Escherichia coli* (фрагмент Кленова). Использование этого фермента для синтеза ДНК в присутствии случайных гексануклеотидных праймеров могло позволить увеличить количество ДНК вдвое за счет репликации второй цепи на каждой из последовательностей денатурированной двунитевой ДНК (Klenow, Henningsen 1970). Основанные на этом методе подходы до сих пор применяют для мечения ДНК как в протоколах ник-трансляции, так и праймерного мечения ДНК, которые используют для визуализации ДНК при проведении молекулярно-генетических исследований (Сайфитдинова 2014).

Вновь к решению проблемы полногеномной амплификации исследователи подошли после разработки метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) и появления в арсенале биологов термостабильной ДНК полимеразы Taq из бактерии *Thermus aquaticus* (Saiki et al. 1988). В 1992 году для полногеномной амплификации был разработан метод на основе ПЦР с использованием вырожденных праймеров (*degenerate oligonucleotide primed*, DOP-ПЦР), который

основан на использовании праймеров, внутренняя последовательность которых состоит из шести случайных нуклеотидов: 5'-CCGACTC-GAGNNNNNNATGTGG-3' (Telenius et al. 1992). Протокол амплификации начинался циклами с низкотемпературным отжигом и плавным повышением температуры, в результате чего образовывались фрагменты ДНК, фланкированные известной последовательностью, которые можно было амплифицировать в дальнейшем с использованием стандартного протокола ПЦР. Однако выбор инвариантной последовательности 3' конца был основан на ложных представлениях о доле кодирующих последовательностей в геноме, что приводило к неравномерной амплификации с преимущественным обогащением продукта ПЦР-мобильными элементами. Дальнейшее развитие DOP-ПЦР было связано с модификацией последовательностей праймеров и подбором оптимальных условий низкотемпературных циклов. Они легли в основу целого ряда коммерческих наборов для WGA, однако ни один из них так и не смог приблизиться к реальной полноте амплификации ДНК отдельных клеток.

Очередной научный прорыв произошел после развития методов на основе полимераз с геликазной активностью, которые позволили не только амплифицировать участки, обогащенные шпильками, но и разработать подходы для проведения изотермической амплификации. Большая субъединица ДНК полимеразы I Bst из термофильной бактерии *Geobacillus stearothermophilus* (до 2001 г. вид назывался *Bacillus stearothermophilus*), в отличие от фрагмента Кленова, имеет более высокую оптимальную температуру для синтетической активности. Также, в отличие от интактной ДНК-полимеразы I из *Escherichia coli*, подобно фрагменту Кленова этот фермент не имеет 5'-3' экзонуклеазной активности, но имеет дополнительную способность вытеснять из дуплекса вторую нить и продолжать синтез (Aliotta et al. 1996). Использование

полимеразы Bst для WGA легло в основу разработки методов на основе амплификации с множественным вытеснением цепи (*multiple-strand displacement amplification*, MDA), которые позволили увеличить выход продукта в одном раунде синтеза за счет перекрывания фрагментов (Aviel-Ronen et al. 2006). Недостатком этой амплификации было ограничение длины фрагментов из-за особенностей процессивности фермента Bst, который относится к семейству А восстановительных ДНК полимераз, а также накопление ошибок. Попытки WGA на основе MDA предпринимались ранее с использованием полимеразы фага Ф29, выделенной из фага бактерии *Bacillus subtilis* и относящейся к семейству В полимераз, характеризующейся существенно более высокой скоростью работы и точностью (Blanco et al. 1989). Ее использование легло в основу коммерческих наборов, таких как REPLI-g (Qiagen, США), который нашел успешное применение для амплификации малых количеств ДНК при проведении сравнительной геномной гибридизации (Linck, Resch-Genger 2010). Однако метод не получил широкого внедрения в клиническую практику и не прошел сертификацию для применения в диагностике из-за особенностей предложенного протокола выделения ДНК на основе щелочного лизиса, который может иметь непредсказуемые последствия при анализе критически малых количеств ДНК. Использование гексануклеотидных случайных праймеров, обусловленное низким температурным оптимумом работы полимеразы фага Ф29 (30 °C), а также получение неконтролируемого ветвления продукта усложняют процедуры линейаризации ДНК и стандартизации последующего приготовления библиотек для секвенирования нового поколения (*next generation sequencing*, NGS).

Существенным прорывом в развитии методов WGA стало объединение протоколов MDA и DOP-ПЦР, а также разработка протокола MALBAC (Zong et al. 2012); его модификация была стандартизирована компанией Rubicon Biotechnology (в последующем реализуется компанией Takara Bio, США) и по лицензии используется в составе наборов SurePLEX DNA Amplification System (Illumina, США). Особенностью коммерческих наборов для WGA предельно малых количеств ДНК из отдельных клеток стало использование инвариантной части праймеров на основе сочетания двух нуклеотидов G и T и включение шести вариативных (случайных) нуклеотидов в последовательность. Первый этап выполняется с использованием полимера-

зы с геликазной активностью, а на втором этапе используется ПЦР.

С момента разработки упомянутых протоколов стали доступны новые ферменты, выделенные из термофильных штаммов бактерий рода *Geobacillus* (Oscorbin et al. 2015), такие как большая субъединица полимеразы Gth из *Geobacillus thermoleovorans* G3 (Auron ArtScience, США), которая не обладает 5'–3' и 3'–5' экзонуклеазной активностью. Так же, как и полимеразы Bst, этот фермент обладает способностью к вытеснению второй цепи ДНК и может применяться для изотермической амплификации ДНК. При этом оптимальная температура элонгации для этого фермента выше, что позволяет использовать достаточно длинные праймеры, а более высокая резистентность к высоким температурам позволяет использовать его в циклах с кратковременной денатурацией ДНК.

Еще большие перспективы для развития методов полногеномной амплификации для получения надежных данных о молекулярном кариотипе исходных клеток и определения вариаций количества копий (*copy number variation*, CNV) отдельных фрагментов ДНК дают описанные недавно мутации в гене полимеразы Taq, в частности Klentaq1 с дополнительной заменой D732N (Barnes et al. 2021). Лишенный экзонуклеазной активности, но обладающий способностью к вытеснению второй цепи ДНК, этот фермент сохраняет все преимущества полимеразы Taq, которые позволяют использовать его в протоколах с множественными циклами высокотемпературной денатурации ДНК.

В настоящей работе мы разработали протокол на основе использования частично вырожденных праймеров и сочетания методов MDA и DOP-ПЦР с последующей ПЦР для надежной полногеномной амплификации предельно малых количеств ДНК. Мы показали возможность применения для его реализации различных полимераз, как отдельно взятых, так и в виде смеси ферментов, а также впервые показали возможность применения для WGA полимеразы Klentaq1 с мутацией D732N. Это открывает дальнейшие перспективы при разработке новых протоколов для решения различных задач. Описанный в этой статье метод позволяет получить ампликат, пригодный для дальнейшего анализа с использованием метода массового параллельного секвенирования NGS и получения данных о молекулярном кариотипе исходных отдельных клеток.

Материалы и методы

Для отработки метода амплификации использована стандартная мужская ДНК (Human Reference DNA, Male), поставляемая производителем в концентрации 0,2 мкг/мкл (Agilent Technologies Inc, США), разведенная водой для применения в одной реакции 20 пг ДНК, что соответствует ожидаемому количеству ДНК из нескольких клеток человека. Синтез олигонуклеотидов осуществляли фосфоамидным методом с использованием прибора ASM-800 (Биоссет, Новосибирск) с последующей очисткой в полиакриламидном геле. Для апробации метода были использованы коммерчески доступные ферменты, а также клонированные и полученные в лабораторных условиях белки на основе описаний в открытой научной литературе. Для выделения и очистки белков использована хроматографическая система NGC Discover 10 (Bio-Rad, США). Концентрацию ДНК в образцах после проведения WGA измеряли на флуориметре Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific, США) с использованием интеркалирующего красителя Pico488 (Lumiprobe, Москва). Для сравнения результатов амплификации применяли коммерческие наборы реактивов для амплификации ДНК из отдельных клеток SurePLEX DNA Amplification System (Illumina, США). Подготовка библиотек проводили при помощи наборов VeriSeq PGS с последующим секвенированием (NGS) на аппарате MiSeq System (Illumina, США). Анализ на качество определения молекулярного кариотипа исходного образца выполняли с использованием программного обеспечения BluFuse Multi v4.3 (Illumina, США).

Результаты

В настоящей работе мы разработали протокол на основе использования частично вырожденных праймеров и сочетания методов MDA и DOP-ПЦР с последующей ПЦР для полногеномной амплификации малых количеств ДНК. Для обеспечения совместимости метода с существующими коммерческими наборами реактивов и автоматизированного анализа в качестве фиксированной части праймеров использовалась олигонуклеотидная последовательность, состоящая из комбинации 18 оснований G и T (рис. 1, черные прямоугольники). На первом этапе для праймирования фрагментов в состав олигонуклеотидов мы включили вырожденный участок из шести оснований, который обеспечивает достаточно равномерную посадку праймеров на высокомолекулярной геномной ДНК вне зависимости от последовательности. Для сокращения потенциала к димеризации на 3' конце были дополнительно введены нуклеотиды G и T (рис. 1, белые прямоугольники). На первом этапе исследования наиболее равномерную амплификацию ДНК человека с получением фрагментов оптимальной для последующего секвенирования методом NGS показало использование пары праймеров: 5'-TGTGTTGGGTGTGTTTGGNNNNNNNGG и 5'-TGTGTTGGGTGTGTTTGGNNNNNNNTTT. На втором этапе для осуществления амплификации предварительно праймированных фрагментов использовался укороченный праймер 5'-TGTGTTGGGTGTGTTTGG (рис. 1), который в этом случае служил в качестве как прямого, так и обратного праймера, т. к. первый этап обеспечил присутствие на концах праймиро-

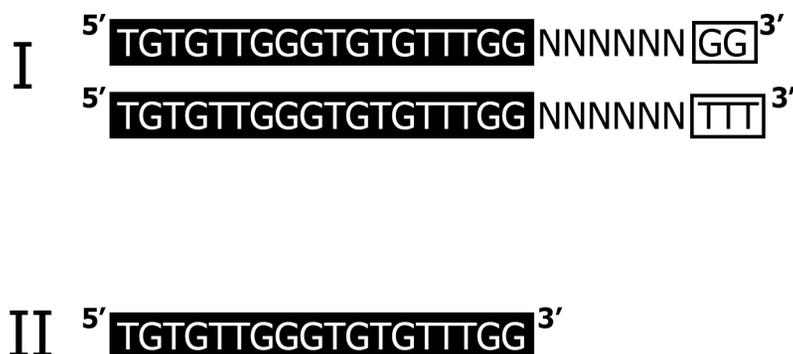


Рис. 1. Последовательности олигонуклеотидов, использованные в качестве праймеров на первом и втором этапах WGA

Fig. 1. Oligonucleotide sequences used as primers in the first and second WGA steps

ванных фрагментов ДНК соответствующих идентичных последовательностей.

Для проведения второго этапа, представляющего из себя ПЦР с температурой отжига праймеров 60 °С, была использована полимеразы Taq (ООО «Бигль», Санкт-Петербург) в стандартном аммонийном буфере (рН 8,8) с 2,5 мМ MgCl₂. Это позволило минимизировать влияние особенностей второго этапа на результат WGA и провести сравнение использования разных методов MDA. Контрольный образец амплифицировали с использованием набора реактивов SurePLEX (Illumina, США) согласно протоколу производителя. После проведения второго этапа WGA проводили измерение концентрации ДНК и электрофорез в агарозном геле с маркером молекулярного веса ДНК Step 100 Long (Биолабмикс, Новосибирск).

Для отработки оптимальных условий проведения первого этапа использовали различные ферменты и их комбинации. Исследование было направлено на поиск оптимальных условий фланкирования последовательностей с использованием вырожденных праймеров и амплификации перекрывающихся фрагментов ДНК, чтобы достичь более равномерного покрытия и в то же время избежать преимущественной

амплификации повторяющихся элементов генома.

Для проведения первого этапа амплификации с вырожденными праймерами использовали коммерчески доступные полимеразы, а также ферменты, полученные на основе опубликованных протоколов как по отдельности, так и в различных сочетаниях (рис. 2). В частности, использовали полимеразы: Taq (Бигль, Санкт-Петербург); Bst, клонированная из штамма *Geobacillus stearothermophilus* (Aliotta et al. 1996); Gth (Auron ArtScience, США), Pfu, представляющая собой ДНК полимеразу семейства В полимераз, обладающих 3'–5' экзонуклеазной активностью, из *Pyrococcus furiosus* (Lundberg et al. 1991); Fusion, представляющая собой полимеразу Pfu, слитая с ДНК связывающим доменом *Nanoarchaeum equitans* (Olszewski et al. 2017); Klentaq1 с заменой D732N, полученная в результате направленного мутагенеза экспрессионного вектора, несущего полимеразу Taq (Barnes et al. 2021). Смесь ферментов Gth + Pfu использовали в соотношении 1:1, Bst + Pfu — 2:1, Bst + Fusion — 4:1, Pfu + Fusion — Pfu + Fusion и Gth + Fusion — 2:1.

Первый этап амплификации проводили в объеме 15 мкл. Для полимераз Taq и Klentaq1

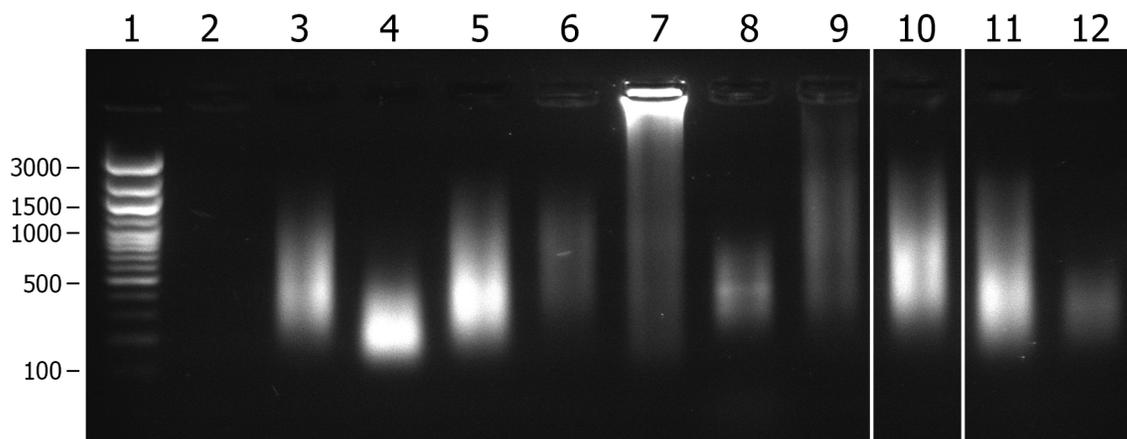


Рис. 2. Результат электрофореза ДНК в 1,8% агарозе. 1 — ДНК маркера, размеры длин в числе пар оснований отмечены слева. 2–12 — результаты WGA 20 пг ДНК человека по одинаковому протоколу с использованием на первом этапе различных полимераз: 2–9 — буфер, адаптированный для полимеразы Bst, 10 — коммерческие буферные растворы набора SurePLEX, 11, 12 — буфер для полимеразы Taq, идентичный по составу буферу для второго этапа амплификации. На первом этапе использованы полимеразы: 2 — Bst, 3 — Gth + Pfu, 4 — Gth, 5 — Bst + Pfu, 6 — Fusion, 7 — Bst + Fusion, 8 — Pfu + Fusion, 9 — Gth + Fusion, 10 — Preamp enzyme коммерческого набора SurePLEX, 11 — Klentaq1 D732N, 12 — Taq

Fig. 2. The result of DNA electrophoresis in 1.8% agarose. 1 — marker DNA, lengths in the number of base pairs are marked on the left. 2–12 — WGA results of 20 picograms of human DNA according to the same protocol using different polymerases at the first stage. 2–9 — the use of a buffer adapted for Bst polymerase. 10 — the use of commercial buffer solutions of the SurePLEX kit. 11–12 — the use of a buffer for Taq polymerase. Its composition is identical to the buffer used in the second stage of amplification. The following polymerases were used at the first stage: 2 — Bst, 3 — Gth + Pfu, 4 — Gth, 5 — Bst + Pfu, 6 — Fusion, 7 — Bst + Fusion, 8 — Pfu + Fusion, 9 — Gth + Fusion, 10 — Preamp enzyme commercial kit SurePLEX, 11 — Klentaq1 D732N, 12 — Taq

D732N использован стандартный аммонийный буфер (pH 8,8) с 2,5 мМ $MgCl_2$. Для остальных ферментов и их комбинаций использован адаптированный буфер с высоким содержанием магния следующего состава: 20 мМ Tris-Трис-НСl (pH 8,8), 10 мМ KCl, 10 мМ $(NH_4)_2SO_4$, 2 мМ $MgSO_4$, 0,1% Tween 20, 8 мМ $MgCl_2$. Концентрация каждого из нуклеотидов в реакционной смеси составила 1,33 мМ, а каждый из пары вырожденных праймеров добавляли до конечной концентрации 0,8 мкМ. Реакцию проводили в термоциклере T100 (Bio-Rad, США) по следующему протоколу: предварительная денатурация 2 мин при 95 °С; внесение соответствующей полимеразы на льду; далее 12 циклов: 95 °С 15 сек, 15 °С 50 сек, 25 °С 40 сек, 35 °С 30 сек, 65 °С 40 сек, 75 °С 40 сек; охлаждение реакционной смеси до 4 °С.

Полученные результаты показали эффективность фланкирования фрагментов ДНК с применением разработанных вырожденных праймеров в цикле с низкотемпературными этапами отжига, с медленным поднятием температуры до оптимальной для элонгации. Различия в эффективности по результатам двух этапов амплификации определяются стабильностью конкретных ферментов при высоких температурах, а также их процессивностью. Потенциально все ферменты, обладающие вытесняющей активностью самостоятельно или в смеси, показали удовлетворительный результат, за исключением полимеразы Bst, которая неустойчива к высоким температурам и не смогла обеспечить достаточный синтез фланкированных фрагментов. При использовании полимераз без вытесняющей активности также наблюдается эффективное фланкирование, однако общее количество продукта меньше, а также в некоторых случаях отчетливо видны более яркие полосы (бэнды) на фоне шмеров, что свидетельствует об избирательной амплификации отдельных районов и может привести к перекосу в сторону более интенсивной амплификации повторяющихся элементов генома. Самый близкий по выходу полученной ДНК (около 50 нг в микролитре в финальном объеме 75 мкл) и разбросу длин фрагментов был получен при использовании на первом этапе смеси полимераз Bst + Pfu в соотношении 2:1. Также достаточно многообещающим выглядит использование модифицированной полимеразы KlenTaq1 D732N, которая может быть перспективной для разработки протокола WGA с большим числом высокотемпературных этапов цикла.

Для анализа применимости полученных амплификатов с целью определения количества копий отдельных сегментов генома или целых хромосом с использованием коммерческих алгоритмов, были протестированы различные варианты протоколов двухступенчатой амплификации для сочетания полимераз Bst + Pfu на первом этапе и ПЦР на втором (рис. 3). Мы сравнили варианты соотношения числа циклов первого и второго этапов, приводящие к получению приблизительно одинакового количества ДНК, секвенировали образцы и проанализировали с использованием программного обеспечения BluFuse Multi v4.3, разработанного для анализа молекулярного кариотипа на основе данных NGS с использованием реактивов SurePLEX DNA Amplification System на секвенаторе MiSeq System. В образце, полученном в результате амплификации 20 пг референсной ДНК здорового мужчины (Agilent Technologies Inc., США) с 17 циклами фланкирования в процессе амплификации с вытеснением второй цепи и последующими 10 циклами ПЦР (рис. 3А), система определила снижение покрытия в области центромеры хромосомы 7 и обоих плеч хромосомы 19, тогда как протокол с 12 циклами на первом этапе и 16 циклами ПЦР позволил получить амплификат, интерпретированный как не имеющий изменения числа копий (рис. 3Б). Сравнение сырых прочтений секвенирования не выявило значительных отличий в структуре полученных данных, за исключением разницы в представленности некоторых повторяющихся последовательностей, в частности, рассеянных повторов Alu, представляющих собой короткие интерсперсные мобильные элементы, относящиеся к семейству SINE, а также некоторых сателлитов. Увеличение их копийности в образце, подвергнутому большему числу циклов ПЦР, может свидетельствовать о некотором насыщении амплификата повторяющимися элементами генома, однако результат анализа с использованием коммерческого программного обеспечения свидетельствует о наличии в нем корректирующих алгоритмов. Таким образом, варьируя число циклов первого и второго этапа, можно добиться полной совместимости предложенного метода WGA с существующими методами анализа и интерпретации данных, а при необходимости смещение в сторону увеличения числа циклов первого этапа может позволить сократить степень смещения представленности повторяющихся элементов генома в образцах, подвергающихся WGA.

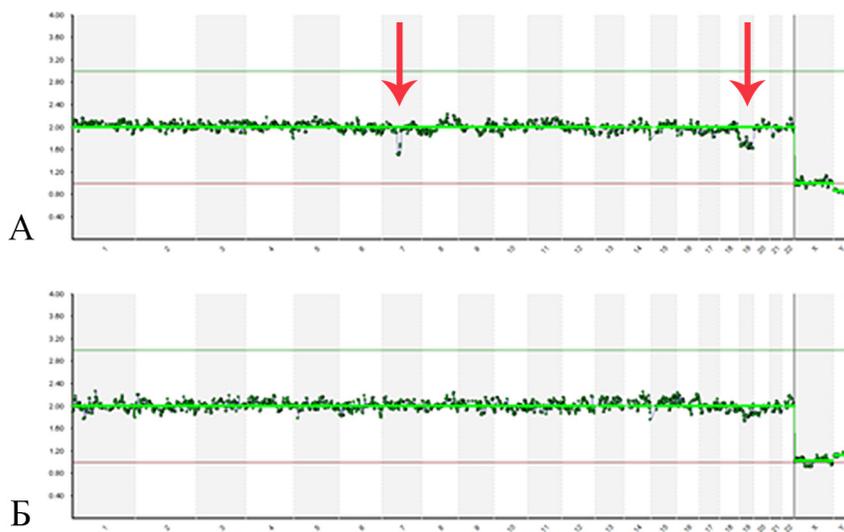


Рис. 3. Визуализация молекулярного кариотипа по данным секвенирования NGS 20 пг контрольной мужской ДНК с определением относительного числа хромосомных локусов на основе анализа покрытия. А — результат анализа образца после 17 циклов MDA и 10 циклов ПЦР. Б — результат анализа образца после 12 циклов MDA и 16 циклов ПЦР. Красными стрелками отмечены участки генома, распознанные как недостаточно представленные в исходном образце

Fig. 3. Molecular karyotype from NGS sequencing data of 20 picograms of control male DNA with determination of the relative number of chromosomal loci based on coverage analysis. A — result of the sample analysis after 17 MDA cycles and 10 PCR cycles, B — result of the sample analysis after 12 MDA cycles and 16 PCR cycles. Red arrows denote genome regions recognized as underrepresented in the original sample

Обсуждение

Комбинированный метод амплификации ДНК, сочетающий использование частично вырожденных праймеров, изотермическую амплификацию с вытеснением второй цепи и двухступенчатый протокол амплификации, показал возможность использования такого продукта для надежного определения молекулярного кариотипа нескольких клеток на основе последующего секвенирования NGS. Использование относящихся к различным семействам полимераз, обладающих от природы или в результате введенных в них модификаций способностью к вытеснению второй цепи, существенно расширяет перспективы развития методов исследования отдельных клеток.

В результате проведенного исследования показана возможность эффективного использования смеси ферментов Pfu и Bst в присутствии 10 мМ ионов магния для осуществления циклической реакции MDA с фланкированием фрагментов вырожденными праймерами, несущими константный адаптер, несмотря на то, что индивидуальная полимеразная активность Bst не сохраняется в условиях периодического нагревания до температуры денатурации. Наибольшую практическую перспективу, на наш взгляд, имеет использование модифицирован-

ного фермента KlenTaq1, несущего мутацию D732N (Barnes et al. 2021). При описании свойства этого фермента авторы показали потенциал его использования для протоколов петлевой изотермической амплификации (*Loop-mediated isothermal amplification*, LAMP), однако в исследовании не дана оценка возможности применения KlenTaq1 D732N в протоколах на основе MDA, в частности для проведения WGA. Этот фермент представляет собой укороченный вариант полимеразы Taq, лишенный экзонуклеазного домена, что может иметь значение для предотвращения имеющей место постепенной деградации амплификата при длительном хранении под действием остаточной активности ферментов в образцах. В то же время KlenTaq1 D732N обладает сходной с Taq термостабильностью и работает с одинаковой эффективностью в стандартных буферах для Taq полимеразы (содержащих $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ или KCl) в широком диапазоне концентрации ионов магния (от 1 до 4 мМ). Это открывает потенциал для создания на ее основе протокола WGA с однократным добавлением всех компонентов в пробирку, что является важным для сокращения рисков контаминации образца и уменьшает риски влияния человеческого фактора при обработке большого числа однотипных образцов.

Введение мутации D732N в аминокислотную последовательность фермента KlenTaq1 не только увеличило его процессивность и добавило способность к вытеснению второй цепи ДНК из дуплекса, по сравнению с исходной версией KlenTaq1, но и дополнительно снабдило фермент новой активностью — ревертазой (Barnes et al. 2021). Комбинация РНК-зависимой ДНК полимеразы с перечисленными выше свойствами фермента позволяет задуматься о потенциале его использования для разработки протоколов для транскриптного анализа отдельных клеток.

Важно отметить, что использование ПЦР для WGA неизбежно приводит к экспоненциальному росту в образцах повторяющихся последовательностей, что необходимо учитывать при потребности поддержания исходного образца в коллекциях, а также избегать множественных циклов ПЦР, отдавая предпочтение амплификации на основе MDA. При использовании различного числа циклов на первом и втором этапах амплификации можно варьировать степень обогащения конечного продукта повторяющимися элементами генома. Используемые при исследовании протоколы позволили подобрать условия для получения амплификата, результаты секвенирования которого могут быть проанализированы с применением распространенных коммерческих алгоритмов и программного обеспечения для выявления численных хромосомных аномалий. Этот метод может быть реализован в подготовке материала для анализа молекулярного кариотипа отдельных клеток, в том числе для преимплантационного генетического тестирования эмбрионов человека и исследования опухолевых клеток, а также может оказаться полезным в областях биомедицины и судебно-медицинских исследований, где востребована равномерная амплификация предельно малых количеств ДНК. При необходимости он может быть адаптирован для амплификации образцов, полученных в результате микродиссекции как отдельных клеток, так и сегментов хромосом. Получаемые таким образом образцы ДНК, в отличие от получаемых из клеток и отдельных хромосом, отсортированных методом проточной цитометрии, часто фрагментированы, поэтому плохо поддаются изотермической MDA с гексануклеотидными праймерами с формированием конкатомеров. В случае применения циклической MDA с фланкированием предложенными нами праймерами фрагментированные образцы можно будет успешно амплифицировать, увеличив число циклов первого этапа.

Блочная структура праймеров позволяет вносить в них модификации для адаптации метода к имеющемуся оборудованию, программному обеспечению, используемому для анализа данных, а также применять для приготовления библиотек штрихкодирования методом ПЦР за счет внесения дополнительных участков в последовательность праймера, используемого на втором этапе WGA.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии потенциального или явного конфликта интересов.

Conflict of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest, either existing or potential.

Вклад авторов

- а. Сайфитдинова Алсу Фаритовна — планирование исследования, отработка методов, анализ результатов, написание текста, подготовка иллюстраций;
- б. Павлова Ольга Андреевна — синтез олигонуклеотидов, отработка условий амплификации;
- в. Зелинский Андрей Андреевич — клонирование генов ферментов, направленный мутагенез рекомбинантных генно-инженерных конструкций, выделение и очистка белков в препаративных количествах;
- г. Рябинина Марина Владиславовна — осуществление биотехнологических этапов исследования;
- д. Глов Олег Сергеевич — подготовка библиотек ДНК и секвенирование образцов методом NGS;
- е. Богомаз Денис Игоревич — оптимизация условий амплификации ДНК и синтез олигонуклеотидов;
- ж. Рубель Александр Анатольевич — реализация биотехнологического этапа исследования.

Author Contributions

- a. Alsu F. Saifitdinova — planning the study, development of methods, analysis of the results, writing the text, preparation of illustrations, formatting the manuscript;
- b. Olga A. Pavlova — the synthesis of oligonucleotides, the development of amplification conditions;

- c. Andrew A. Zelinsky — cloning of enzyme genes, directed mutagenesis of recombinant genetically engineered constructs, isolation and purification of proteins in preparative quantities;
- d. Marina V. Ryabinina — biotechnological phases of the research;
- e. Oleg S. Glotov — DNA libraries preparation and sample sequencing by NGS;
- f. Denis I. Bogomaz — optimization of DNA amplification conditions and synthesis of oligonucleotides;
- g. Aleksandr A. Rubel — biotechnological phase of the research.

Благодарности

Авторы благодарны Марии Сергеевне Рубель за предоставление штамма *Geobacillus stearothermophilus*.

Acknowledgements

The authors are grateful to Maria S. Rubel for providing the strain of *Geobacillus stearothermophilus*.

Литература

- Сайфитдинова, А. Ф. (2014) *Двумерная флуоресцентная микроскопия для анализа биологических образцов*. 3-е изд. СПб.: Свое издательство, 110 с.
- Aliotta, J. M., Pelletier, J. J., Ware, J. L. et al. (1996) Thermostable *Bst* DNA polymerase I lacks a 3'→5' proofreading exonuclease activity. *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering*, vol. 12, no. 5–6, pp. 185–195. [https://doi.org/10.1016/S1050-3862\(96\)80005-2](https://doi.org/10.1016/S1050-3862(96)80005-2)
- Aviel-Ronen, S., Qi Zhu, C., Coe, B. P. et al. (2006) Large fragment *Bst* DNA polymerase for whole genome amplification of DNA from formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *BMC Genomics*, vol. 7, no. 1, article 312. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-312>
- Barnes, W. M., Zhang, Z., Kermekchiev, M. B. (2021) A single amino acid change to *Taq* DNA polymerase enables faster PCR, reverse transcription and strand-displacement. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 8, article 553474. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.553474>
- Blanco, L., Bernad, A., Lázaro, J. M. et al (1989) Highly efficient DNA synthesis by the phage φ29 DNA polymerase: Symmetrical mode of DNA replication. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 264, no. 15, pp. 8935–8940. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)81883-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)81883-X)
- Klenow, H., Henningsen, I. (1970) Selective elimination of the exonuclease activity of the deoxyribonucleic acid polymerase from *Escherichia coli* B by limited proteolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 65, no. 1, pp. 168–175. <https://doi.org/10.1073/pnas.65.1.168>
- Linck, L., Resch-Genger, U. (2010) Identification of efficient fluorophores for the direct labeling of DNA via rolling circle amplification (RCA) polymerase φ29. *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 45, no. 12, pp. 5561–5566. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.09.005>
- Lundberg, K. S., Shoemaker, D. D., Adams, M. W. W. et al. (1991) High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene*, vol. 108, no. 1, pp. 1–6. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(91\)90480-Y](https://doi.org/10.1016/0378-1119(91)90480-Y)
- Olszewski, M., Śpibida, M., Bilek, M., Krawczyk, B. (2017) Fusion of *Taq* DNA polymerase with single-stranded DNA binding-like protein of *Nanoarchaeum equitans* — Expression and characterization. *PLoS ONE*, vol. 12, no. 9, article e0184162. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0184162>
- Oscorbin, I. P., Boyarskikh, U. A., Filipenko, M. L. (2015) Large fragment of DNA polymerase I from *Geobacillus* sp. 777: Cloning and comparison with DNA polymerases I in practical applications. *Molecular Biotechnology*, vol. 57, no. 10, pp. 947–959. <https://doi.org/10.1007/s12033-015-9886-x>
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S. et al. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, vol. 239, no. 4839, pp. 487–491. <https://doi.org/10.1126/science.2448875>
- Telenius, H., Carter, N. P., Bebb, C. E. et al. (1992) Degenerate oligonucleotide-primed PCR: General amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics*, vol. 13, no. 3, pp. 718–725. [https://doi.org/10.1016/0888-7543\(92\)90147-K](https://doi.org/10.1016/0888-7543(92)90147-K)
- Zong, C., Lu, S., Chapman, A. R., Xie, X. S. (2012) Genome-wide detection of single-nucleotide and copy-number variations of a single human cell. *Science*, vol. 338, no. 6114, pp. 1622–1626. <https://doi.org/10.1126/science.1229164>

References

- Aliotta, J. M., Pelletier, J. J., Ware, J. L. et al. (1996) Thermostable *Bst* DNA polymerase I lacks a 3'→5' proofreading exonuclease activity. *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering*, vol. 12, no. 5–6, pp. 185–195. [https://doi.org/10.1016/S1050-3862\(96\)80005-2](https://doi.org/10.1016/S1050-3862(96)80005-2) (In English)

- Aviel-Ronen, S., Qi Zhu, C., Coe, B. P. et al. (2006) Large fragment *Bst* DNA polymerase for whole genome amplification of DNA from formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *BMC Genomics*, vol. 7, no. 1, article 312. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-312> (In English)
- Barnes, W. M., Zhang, Z., Kermekchiev, M. B. (2021) A single amino acid change to Taq DNA polymerase enables faster PCR, reverse transcription and strand-displacement. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 8, article 553474. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.553474> (In English)
- Blanco, L., Bernad, A., Lázaro, J. M. et al (1989) Highly efficient DNA synthesis by the phage ϕ 29 DNA polymerase: Symmetrical mode of DNA replication. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 264, no. 15, pp. 8935–8940. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)81883-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)81883-X) (In English)
- Klenow, H., Henningsen, I. (1970) Selective elimination of the exonuclease activity of the deoxyribonucleic acid polymerase from *Escherichia coli* B by limited proteolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 65, no. 1, pp. 168–175. <https://doi.org/10.1073/pnas.65.1.168> (In English)
- Linck, L., Resch-Genger, U. (2010) Identification of efficient fluorophores for the direct labeling of DNA via rolling circle amplification (RCA) polymerase ϕ 29. *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 45, no. 12, pp. 5561–5566. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.09.005> (In English)
- Lundberg, K. S., Shoemaker, D. D., Adams, M. W. W. et al. (1991) High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene*, vol. 108, no. 1, pp. 1–6. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(91\)90480-Y](https://doi.org/10.1016/0378-1119(91)90480-Y) (In English)
- Olszewski, M., Špibida, M., Bilek, M., Krawczyk, B. (2017) Fusion of *Taq* DNA polymerase with single-stranded DNA binding-like protein of *Nanoarchaeum equitans* — Expression and characterization. *PLoS ONE*, vol. 12, no. 9, article e0184162. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0184162> (In English)
- Oscorbin, I. P., Boyarskikh, U. A., Filipenko, M. L. (2015) Large fragment of DNA polymerase I from *Geobacillus* sp. 777: Cloning and comparison with DNA polymerases I in practical applications. *Molecular Biotechnology*, vol. 57, no. 10, pp. 947–959. <https://doi.org/10.1007/s12033-015-9886-x> (In English)
- Saifitdinova, A. F. (2014) *Dvumernaya fluorestsentnaya mikroskopiya dlya analiza biologicheskikh obraztsov [Two-dimensional fluorescence microscopy for the analysis of biological samples]*. 3rd ed. Saint Petersburg: Svoe izdatel'stvo Publ., 110 p. (In Russian)
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S. et al. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, vol. 239, no. 4839, pp. 487–491. <https://doi.org/10.1126/science.2448875> (In English)
- Telenius, H., Carter, N. P., Bebb, C. E. et al. (1992) Degenerate oligonucleotide-primed PCR: General amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics*, vol. 13, no. 3, pp. 718–725. [https://doi.org/10.1016/0888-7543\(92\)90147-K](https://doi.org/10.1016/0888-7543(92)90147-K) (In English)
- Zong, C., Lu, S., Chapman, A. R., Xie, X. S. (2012) Genome-wide detection of single-nucleotide and copy-number variations of a single human cell. *Science*, vol. 338, no. 6114, pp. 1622–1626. <https://doi.org/10.1126/science.1229164> (In English)