



УДК 577.213.37; 577.151.36

КОМБИНИРОВАННЫЙ МЕТОД ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ ДНК (HDA-RCA) ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ АНАЛИЗА

© 2026 г. П. А. Чиркова*,[#], С. А. Суржиков*, И. В. Гречишникова*,
А. В. Чудинов*, С. А. Лапа*

* Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Россия, 119991 Москва, ул. Вавилова, 32

Поступила в редакцию 04.08.2025 г.

После доработки 23.08.2025 г.

Принята к публикации 27.08.2025 г.

Предложен метод изотермической амплификации из полноразмерной геномной ДНК без предварительного фрагментирования, представляющий из себя комбинацию хеликазозависимой амплификации (HDA) и амплификации по типу катящегося кольца (RCA). Предварительная амплификация HDA по асимметричному типу позволяет получать короткие одноцепочечные продукты, стерически доступные для лигазы, использующейся в последующей RCA. Такой комбинированный подход позволяет существенно повысить чувствительность анализа в изотермическом режиме, тем самым предоставляя возможность проведения анализа образцов геномной ДНК в одной пробирке (“one-pot”), что позволяет проводить анализ вне специализированных лабораторий в местах оказания помощи (“point of care”).

Ключевые слова: изотермическая амплификация, лигирование, HDA, RCA

DOI: 10.7868/S1998286026010055

ВВЕДЕНИЕ

Амплификация по типу катящегося кольца (RCA) – чувствительный и специфичный метод изотермической амплификации нуклеиновых кислот [1–3]. RCA находит широкое применение в анализе нуклеиновых кислот: в выявлении однонуклеотидного полиморфизма генов [4], метилировании генов [5], селекции аптамеров [6–7], секвенировании [8], а также в анализе белков, например, в иммуноанализе [9]. Ключевая иницирующая стадия проведения RCA – образование кольцевого олигонуклеотида, который служит матрицей для последующей амплификации. Кольцевой фрагмент получают лигированием олигонуклеотидного зонда (“padlock probe”), содержащего 3'- и 5'-концевые последовательности, комплементарные выбранной мишени. Для лигирования чаще всего используют T4 ДНК-лигазу, ДНК-лигазу *Escherichia coli* и термостабильные ДНК-лигазы: Taq, Ampligase, Pfu [4, 10–12]. В качестве мишени могут выступать короткие одноцепочечные син-

тетические олигонуклеотиды, называемые адаптерами, а также одноцепочечная РНК или ДНК [13–17]. Авторы [16, 17] отмечают, что лигирование с вирусной РНК длиннее 3000 нт затруднено. Возможно, это связано с образованием вторичных структур. Например, один из способов детектирования вирусной РНК – использование многостадийного метода, включающего следующие этапы: предварительную амплификацию образцов методом ПЦР с добавлением “хвостовых” обратных праймеров, содержащих последовательность для амплификации смещением цепи (SDA); проведение SDA с образованием короткого одноцепочечного продукта, выступающего специфичным праймером для последующего RCA-анализа; добавление в систему предварительно лигированного кольцевого олигонуклеотида и проведение RCA [17]. Авторы [17] предлагают использовать предварительную амплификацию вирусной РНК для образования специфичного праймера к предварительно лигированному зонду “padlock probe” и последующего RCA-анализа.

Сокращения: HDA – хеликазозависимая амплификация; one-pot – в одной пробирке, без переноса биологического материала; padlock probe – зонд, образующий кольцо, в RCA-анализе; RCA – амплификация по типу катящегося кольца; SDA – амплификация смещением цепи.

[#] Автор для связи: (эл. почта: polinazavr2002@mail.ru).

Проведение RCA с геномной ДНК осложняется тем, что генетическая мишень присутствует в форме длинной двухцепочечной молекулы ДНК, труднодоступной для лигазы. Например, авторы [18] в своей статье затронули проблему проведения RCA при анализе двухцепочечной бактериальной ДНК *Mycobacterium tuberculosis*. Существует несколько подходов получения кольцевого олигонуклеотида с образцов геномной ДНК. Один из способов подготовки образца для RCA – расщепление геномной ДНК на более короткие фрагменты. Авторы [19] проводят сравнение ультразвукового воздействия и эндонуклеаз и отмечают, что использование ультразвука не требует наличия сайтов рестрикции и может проводиться на любом образце без предварительного скрининга, однако данный метод обладает недостаточно высокой воспроизводимостью и специфичностью из-за неизбежного расщепления. Использование эндонуклеаз – это более специфичный метод, однако он требует от ДНК-мишени наличия определенных сайтов рестрикции в зависимости от выбранной нуклеазы, что приводит к необходимости оптимизации под каждый тип исследуемого образца. Другой способ – предварительная амплификация геномной ДНК методом ПЦР, приводящая к образованию более коротких продуктов (ампликонов), с которых проводят лигирование детектирующего олигонуклеотида “padlock probe” и RCA-анализ [4, 12, 18]. Недостаток данного способа – проведение предварительной амплификации с термоциклированием и последующего лигирования с многократным плавлением дуплексов, что требует наличия специализированного оборудования.

Еще один способ – использование пептидных нуклеиновых кислот для частичного расплетания комплементарных участков геномной ДНК при лигировании [20]. Данные структуры обладают высокой аффинностью к комплементарным цепям, однако требуется тщательная оптимизация их структуры для каждого типа образцов, и их синтез затруднен.

Поскольку большинство клинических анализов проводится на выделенной геномной ДНК, то разработка эффективного способа лигирования для проведения RCA остается актуальной задачей. Цель данного исследования – разработка комбинированного метода изотермической амплификации HDA-RCA, позволяющего увеличить биодоступность протяженной двухцепочечной ДНК для лигазы, а также повысить специфичность и чувствительность анализа геномной ДНК по сравнению со стандартными методиками амплификации.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе исследования для получения кольцевого олигонуклеотида в качестве мишени была использована геномная ДНК *Staphylococcus aureus* без предварительной денатурации и с предварительной денатурацией при 95°C. Контрольным образцом выступал короткий синтетический одноцепочечный олигонуклеотид (адаптер) длиной 26 нт. Проверку эффективности лигирования в каждом случае осуществляли методом амплификации по типу катящегося кольца (RCA) с последующей визуализацией продуктов реакции на горизонтальном электрофорезе (рис. 1а).

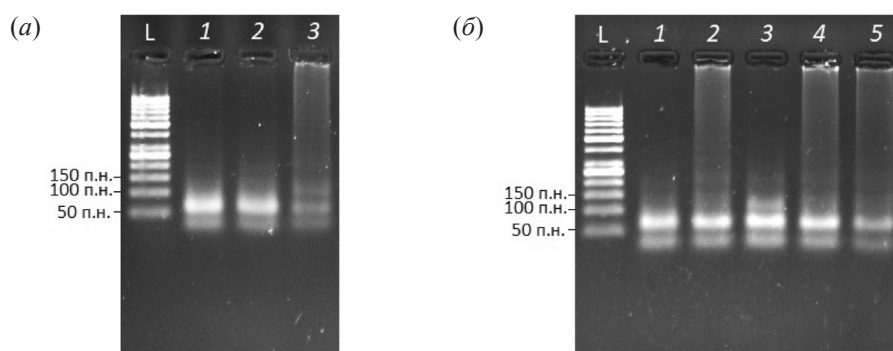


Рис. 1. (а) – Электрофореграмма продуктов RCA при лигировании зонда, замыкающегося в кольцо, с геномной ДНК: L – маркер длин двухцепочечной ДНК GeneRuler 50 bp (Thermo, Латвия), 1 – лигирование с геномной ДНК с предварительной денатурацией, 2 – лигирование с геномной ДНК без предварительной денатурации, 3 – лигирование с синтетического адаптера; (б) – электрофореграмма продуктов RCA после лигирования таргетного олигонуклеотида (зонда, замыкающегося в кольцо) с ампликонами, предварительно полученными методами ПЦР и HDA: L – маркер длин двухцепочечной ДНК GeneRuler 50 bp (Thermo, Латвия), 1 – лигирование с двухцепочечного ампликона 500 нт (получен методом ПЦР), 2 – лигирование с одноцепочечного ампликона 500 нт (получен методом ПЦР), 3 – лигирование с двухцепочечного ампликона 98 нт (получен методом HDA), 4 – лигирование с одноцепочечного ампликона 98 нт (получен методом HDA), 5 – лигирование с синтетического адаптера.

По результатам электрофоретического анализа наблюдали, что проведения предварительной денатурации недостаточно для лигирования олигонуклеотидного зонда, образующего кольцо (“padlock probe”), с геномной ДНК, и в первых двух лунках присутствовало незначительное количество высокомолекулярного продукта, что свидетельствовало о низкой эффективности лигирования. Это могло быть связано с образованием вторичных структур и большой длины ДНК-образцов, создающих стерические затруднения и препятствующие лигированию “padlock probe” с мишени.

Для решения проблемы лигирования с длинных двухцепочечных матриц предложено использование предварительной амплификации, которая позволяет получать более короткие продукты с геномной ДНК, стерически доступные для лигазы и гибридизации с “padlock probe”. Предварительную амплификацию проводили методами ПЦР и хеликазозависимой амплификации (HDA) в симметричном и асимметричном вариантах (при различном молярном соотношении праймеров). Проверку образования продуктов амплификации методами ПЦР, HDA и последующего лигирования с проведением RCA осуществляли методом горизонтального электрофореза (рис. 1б). В качестве контрольного образца также использовали синтетический адаптер длиной 26 нт.

Результаты электрофоретического анализа показали, что лигирование и последующий RCA-анализ прошли высокоэффективно в лунках, где в качестве мишени выступал одноцепочечный продукт. Успешное проведение лигирования с одноцепочечного ампликона могло быть связано с его меньшей длиной по сравнению с геномной ДНК и отсутствием стерических затруднений в виде ДНК-дуплексов.

Показано, что использование предварительной амплификации повышает чувствительность RCA при анализе геномной ДНК. Протоколы ПЦР хорошо воспроизводимы, однако проведение предварительной амплификации методом ПЦР требует проведения термоциклирования и, следовательно, наличия специального оборудования. Метод HDA позволяет нарабатывать продукты длиной 70–120 нт [21]. Таким образом, с помощью HDA возможно получать лишь короткие одноцепочечные продукты, но в изотермическом режиме. Сочетание HDA, лигирования и RCA (HDA-RCA) открывает новые возможности для объединения всех стадий в одну, т.е. созданию “one-pot”-системы анализа геномной ДНК методом RCA.

На рис. 2 представлена предлагаемая схема проведения RCA-анализа образцов геномной ДНК с предварительной хеликазозависимой амплификацией (HDA-RCA).

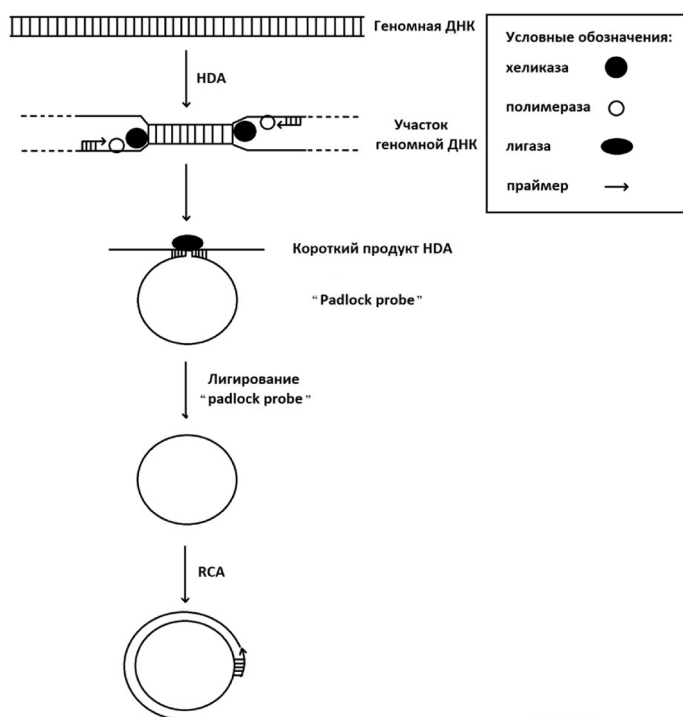


Рис. 2. Схема HDA-RCA для проведения анализа геномной ДНК. Показана предварительная амплификация геномной ДНК с образованием преимущественно одноцепочечного короткого продукта методом HDA, его гибридизация с “padlock probe”, лигирование “padlock probe” и проведение RCA-анализа.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Штаммы. Геномная ДНК *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) была выделена и деконтаминирована на базе ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии (Оболensk, Россия) аналогично методике, представленной в работе [22].

Используемые олигонуклеотиды и праймеры. Конструирование праймеров осуществляли с помощью сетевого ресурса Integrated DNA Technologies (www.idtdna.com), анализ специфичности проводили с помощью алгоритма BLAST (National Institutes of Health, США).

Для проведения ПЦР конструировали праймеры: прямой 5'-TTAGAAGCGTCTTTAG-ATGTGTC-3' и обратный 5'-GGAACAGCGG-GTGTTCAGGTGC-3'. Для проведения HDA были сконструированы два праймера: прямой 5'-TTC-TTTATCTCTGTCATGATTGTCATGTTTC-3' и обратный 5'-CAGCAAGTAAAAGTGCTTCTGCC-GCTTC-3'. Для создания таргетного олигонуклеотидного зонда (кольцевой RCA-матрицы) был проведен анализ последовательности и синтез 90-мерного зонда, замыкающегося в кольцо, фосфорилированного по 5'-концу, с последовательностью 5'-Ph-TTAGAGGCATGTGGTTATGCTAGCA-ACAGATAGACAAGATGGAATGCAGATG-ACGATAGACGATACCTGCCATCGTT-TTGGCTTGCATTA-3', где Ph – фосфат. Для лигирования контрольного образца был сконструирован короткий синтетический олигонуклеотид (адаптер) 5'-CACATGCCTCTAATAATGCAAG-CCAA-3', комплементарный 90-мерному зонду, замыкающемуся в кольцо. Для RCA использовали праймер 5'-GCATTCCATCTTGTCTATCTGTTG-STAGC-3', специфичный к бессмысловому участку зонда, образующего кольцо.

Твердофазный синтез олигонуклеотидов осуществляли с помощью автоматического синтезатора ABI 394 DNA/RNA (Applied Biosystems, США) по стандартному регламенту, очистку производили на колонке BDS Hypersil C18 (Thermo, США).

Проведение ПЦР для получения двухцепочечных и одноцепочечных ампликонов. Реакционная смесь (50 мкл) содержала 5 ед. Hot Start Taq-полимеразы (Сибэнзим, Россия) в буфере той же фирмы, природные дезоксинуклеозидтрифосфаты (dNTP), каждый в концентрации 200 мкМ, праймеры (прямой и обратный) в концентрации 0.2 мкМ каждого (для получения двухцепочечного продукта) или в концентрации 0.2 мкМ прямого и 0.02 мкМ обратного (для получения преимущественно одноцепочечного продукта), полногеномная бактериальная ДНК в качестве матрицы в интервале 10^1 – 10^4 копий.

Реакцию проводили на ДНК-амплификаторе Bioer GeneExplorer GE-48DG (Bioer, Китай). Температурно-временной профиль ПЦР состоял из предварительной денатурации (95°C – 5 мин), за которой следовали 30 циклов: 95°C (денатурация ДНК) – 20 с; 60°C (отжиг праймеров) – 30 с; 72°C (достройка праймеров) – 30 с; завершающая инкубация при 72°C – 5 мин. В результате получали продукт длиной 500 нт. Контроль ПЦР проводили методом горизонтального электрофореза.

Проведение хеликазозависимой амплификации (HDA) для наработки двухцепочечных и одноцепочечных ампликонов. Реакционная смесь (30 мкл) содержала 2.1 мкл ферментативной смеси IsoAmp Enzyme Mix (New England Biolabs, США) и буфера той же фирмы, праймеры (прямой и обратный) в концентрации 0.2 мкМ каждого (для получения двухцепочечного продукта) или в концентрации 0.2 мкМ прямого и 0.02 мкМ обратного (для получения преимущественно одноцепочечного продукта). HDA проводили при 65°C в течение 1 ч на ДНК-амплификаторе Bioer GeneExplorer GE-48DG (Bioer, Китай). В результате получали продукт длиной 98 нт. Контроль HDA проводили методом горизонтального электрофореза.

Лигирование таргетного олигонуклеотидного зонда с различными мишенями. Реакционная смесь (30 мкл) содержала 0.3 мкМ зонда, образующего кольцо, длиной 90 нт, 40 ед. Taq ДНК-лигазы (diaGene, Россия) и буфер той же фирмы, 1 мкл соответствующей мишени. В качестве мишени использовали полногеномную бактериальную матрицу в интервале 10^1 – 10^4 копий без предварительной денатурации и с предварительной денатурацией при 95°C в течение 5 мин, двухцепочечный и одноцепочечный продукты длиной 500 нт, наработанные методом ПЦР, а также двухцепочечный и одноцепочечные продукты длиной 98 нт, полученные методом HDA. Лигирование проводили при 65°C в течение 1 ч. Контроль лигирования осуществляли проведением RCA и разделением полученных продуктов методом горизонтального электрофореза.

Проведение RCA. Реакционная смесь (20 мкл) содержала природные dNTP в концентрации 200 мкМ, 1.6 ед. BST 3.0 ДНК-полимеразы (New England Biolabs, США) и соответствующий ей реакционный буфер в количестве, рекомендуемом производителем, 1 мкл предварительно залигированного с различных мишеней таргетного олигонуклеотида, специфичный праймер в концентрации 0.5 мкМ. Реакцию проводили на ДНК-амплификаторе Gentier 96E (Tianlong, Китай) по следую-

щей программе: 60 мин – 65°C, далее режим хранения при 10°C.

Горизонтальный электрофорез. Полученные в ходе экспериментов продукты разделяли в 4%-ном агарозном геле Agarose LE (Helicon, Россия) в течение 40 мин при 10 В/см. Окрасивание проводили бромистым этидием. Для визуализации продуктов использовали гель-документирующую систему ChemiScope 6200 Touch (Clinx Science Instruments, Китай) в режиме УФ-трансиллюминатора.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработан комбинированный подход HDA в сочетании с RCA (HDA-RCA) для увеличения чувствительности RCA-анализа в исследовании образцов полногеномной двухцепочечной ДНК. Показано, что предварительная амплификация с помощью методов HDA или ПЦР повышает чувствительность RCA-анализа. Использование HDA позволяет проводить предварительную амплификацию в изотермическом режиме (HDA-RCA), что дает возможность объединить стадии амплификации, лигирования и RCA-анализа в одну, открывая перспективу разработки тест-систем для проведения диагностики на местах (в режиме “point of care”) и в одной пробирке без переноса материала (“one-pot”).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность д.б.н. Д.В. Зименкову за предоставление набора реагентов для проведения HDA IsoAmp Enzyme Mix (New England Biolabs, США).

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации для НЦМУ ИМБ РАН “Высокотехнологичная биоэкономика”, соглашение № 075-15-2025-582 от 24.06.2025 г.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования.

Информированное согласие не требовалось.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Все авторы внесли равноценный вклад в написание статьи и дали одобрение на окончательный вариант рукописи.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ali M., Li F., Zhang Z., Zhang K., Kang D., Ankrum J., Le X., Zhao W. // Chem. Soc. Rev. 2014. V. 43. P. 3324–3341.
<https://doi.org/10.1039/C3CS60439J>
2. Gu L., Yan W., Liu L., Wang S., Zhang X., Lyu M. // Pharmaceuticals. 2018. V. 11. P. 35.
<https://doi.org/10.3390/ph11020035>
3. Mohsen M., Kool E. // Acc. Chem. Res. 2016. V. 49. P. 2540–2550.
<https://doi.org/10.1021/acs.accounts.6b00417>
4. Pickering J., Bamford A., Godbole V., Briggs J., Scozzafava G., Roe P., Wheeler C., Ghouze F., Cuss S. // Nucleic Acids Res. 2002. V. 30. P. e60.
<https://doi.org/10.1093/nar/gnf060>
5. Cao A., Zhang C. // Anal. Chem. 2012. V. 84. P. 6199–6205.
<https://doi.org/10.1021/ac301186j>
6. Zhang Z., Ali M., Eckert M., Kang D., Chen Y., Sender L., Fruman D., Zhao, W. // Biomaterials. 2013. V. 34. P. 9728–9735.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.08.079>
7. Yang L., Fung C., Cho E., Ellington A. // Anal. Chem. 2007. V. 79. P. 3320–3329.
<https://doi.org/10.1021/ac062186b>
8. Gao H., Zhang K., Teng X., Li J. // TrAC Trends Anal. Chem. 2019. V. 121. P. 115700.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115700>
9. Schweitzer B., Wiltshire S., Lambert J., O'Malley S., Kukanskis K., Zhu Z., Kingsmore S., Lizardi P., Ward D. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. P. 10113–10119.
<https://doi.org/10.1073/pnas.170237197>
10. Kuhn H., Frank-Kamenetskii M. // FEBS J. 2005. V. 272. P. 5991–6000.
<https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04954.x>
11. Javaheri S., Aliabadian M., Fata A., Najafzadeh M. // J. Mycol. Res. 2014. V. 1. P. 55–62.
<https://doi.org/10.20935/AcadBiol7357>
12. Qi X., Bakht S., Devos K., Gale M., Osbourn A. // Nucleic Acids Res. 2001. V. 29. P. E116.
<https://doi.org/10.1093/nar/29.22.e116>
13. Fire A., Xu S. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995. V. 92. P. 4641–4645.
<https://doi.org/10.1073/pnas.92.10.4641>
14. Li N., Li J., Zhong W. // Electrophoresis. 2008. V. 29. P. 424–432.
<https://doi.org/10.1002/elps.200700410>
15. Wang B., Potter S., Lin Y., Cunningham A., Dwyer D., Su Y., Ma X., Hou Y., Saksena N. // J. Clin. Microbiol.

2005. V. 43. P. 2339–2344.
<https://doi.org/10.1128/jcm.43.5.2339-2344.2005>
16. Kyung K., Ku J., Cho E., Ryu J., Woo J., Jung W., Kim D. // *Bioengineering*. 2023. V. 10. P. 1116.
<https://doi.org/10.3390/bioengineering10101116>
17. Lee H., Kim D.-M., Kim D.-E. // *Analyst*. 2020. V. 145. P. 8002–8007.
<https://doi.org/10.1039/d0an01326a>
18. Schopf E., Liu Y., Deng J., Yang S., Cheng G., Chen Y. // *Anal. Methods*. 2011. V. 3. P. 267–273.
<https://doi.org/10.1039/C0AY00529K>
19. Li X., Du Y., Zhang Y., Kong D. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. P. 6263.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-06594-1>
20. Yaroslavsky A., Smolina, I. // *Chem. Biol.* 2013. V. 20. P. 445–453.
<https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.02.012>
21. Obande G., Banga Singh K. // *Infect. Drug Resist.* 2020. V. 13. P. 455–483.
<https://doi.org/10.2147/idr.s217571>
22. Lapa S.A., Miftakhov R.A., Klochikhina E.S., Ammur Yu.I., Blagodatskikh S.A., Shershov V.E., Zasedatelev A.S., Chudinov A.V. // *Mol. Biol.* 2021. V. 55. P. 828–838.
<https://doi.org/10.1134/S0026893321040063>

Combined Isothermal DNA Amplification Method (HDA-RCA) for Improving Analytical Sensitivity

P. A. Chirkova*,[#], S. A. Surzhikov*, I. V. Grechishnikova*, A. V. Chudinov*, and S. A. Lapa*

* V. A. Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia

[#] E-mail: polinazavr2002@mail.ru

A method for isothermal amplification of full-size genomic DNA without prior fragmentation is proposed. This method combines helicase-dependent amplification (HDA) and rolling circle amplification (RCA). The preliminary HDA amplification in the “asymmetric” mode generates short single-stranded products that are sterically accessible for the ligase used in the subsequent RCA. This combined approach significantly increases the analytical sensitivity in an isothermal mode, thereby enabling genomic DNA sample analysis in a single tube (“one-pot”), which allows analysis to be carried out outside specialized laboratories at the point of care.

Keywords: *isothermal amplification, ligation, HDA, RCA*