

<https://doi.org/10.23946/2500-0764-2020-5-4-133-140>

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В ПРАКТИКЕ СОВРЕМЕННЫХ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ. ЧАСТЬ I: ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ПЦР-ДИАГНОСТИКИ

ВОЛКОВ А.Н.*, НАЧЕВА Л.В.

ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения
Российской Федерации, г. Кемерово, Россия

Резюме

Молекулярно-генетические методы являются неотъемлемой частью многих современных медико-биологических исследований. Среди них наибольшую распространенность получили технологии, основанные на использовании полимеразной цепной реакции. Данный подход воспроизводит естественный механизм репликации нуклеиновых кислот *in vitro*, ограниченный интересующим исследователя участком генома. ПЦР позволяет быстро и с высокой специфичностью амплифицировать фрагмент генома любого биологического объекта. Это определяет широкие возможности ПЦР-диагностики: от выявления возбудителей инфекционных заболеваний человека до установления генетических причин наследственных и мультифакториальных болезней и идентификации личности в судебной медицине. Предлагаемый цикл лекций посвящен описанию важнейших направлений использования ПЦР и сопутствующих методов в практике медицинских и био-

логических исследований. В данной части речь пойдет о теоретических основах ПЦР-диагностики. Рассматриваются ключевые биологические концепции, положенные в основу данного метода, обсуждаются свойства нуклеиновых кислот как объекта изучения. Особое внимание уделяется манипуляциям и техническим решениям, позволяющим осуществить ПЦР на практике. Лекция ориентирована, прежде всего, на студентов медико-биологических специальностей, а также молодых специалистов, планирующих использовать в своей практической деятельности молекулярно-генетические методы исследований.

Ключевые слова: молекулярно-генетические методы, ДНК, ПЦР, электрофорез.

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования

Собственные средства.

Для цитирования:

Волков А.Н., Начева Л.В. Молекулярно-генетические методы в практике современных медико-биологических исследований. часть I: теоретические основы ПЦР-диагностики. *Фундаментальная и клиническая медицина*. 2020; 5(4): 133-140. <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2020-5-4-133-140>

*Корреспонденцию адресовать:

Волков Алексей Николаевич, 650056, Россия, г. Кемерово, ул. Ворошилова, д. 22а, e-mail: volkov_alex@rambler.ru
© Волков А.Н. и др.

LECTURES

MOLECULAR GENETIC TECHNIQUES IN CURRENT BIOMEDICAL RESEARCH. PART I: THEORETICAL BASIS OF PCR DIAGNOSTICS

ALEXEY N. VOLKOV**, LYUBOV V. NACHEVA

Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

English ►

Abstract

Molecular genetic techniques represent an essential part of current biomedical research. Among them, polymerase chain reaction (PCR) is the most widespread. This approach reproduces the natural mechanism of nucleic acid replication *in vitro*, specifically restricted to the region of interest. PCR permits fast and highly specific amplification of the genome fragments belonging to any organism. Therefore, the applications of PCR diagnostics vary from identifying infectious agents to establishing causes of hereditary and multifactorial diseases and to personal identification in forensic medicine. The proposed lecture course discusses the PCR prin-

ciples and cases of its application in biomedical research. Here we describe theoretical concepts and molecular basis of PCR diagnostics as well as chemical features of the nucleic acids. Particular attention is paid to the technical solutions extending the applicability of PCR and to the manipulations for its successful use. The lecture is primarily aimed at biomedical students and junior researchers.

Keywords: molecular genetic methods, DNA, PCR, electrophoresis

Conflict of Interest

None declared.

Funding

There was no funding for this project.

For citation:

Alexey N. Volkov, Lyubov V. Nacheva. Molecular genetic techniques in current biomedical research. Part I: Theoretical basis of PCR diagnostics. *Fundamental and Clinical Medicine*. 2020; 5(4): 133-140. <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2020-5-4-133-140>

****Corresponding author:**

Dr. Alexey N. Volkov, 22a, Voroshilova Street, Kemerovo, 650056, Russian Federation, e-mail: volkov_alex@rambler.ru

© Alexey N. Volkov et al.

Введение

В одном из сентябрьских номеров 1998 года авторитетное издание «The New York Times» опубликовало примечательную статью под заголовком «Scientist at Work / Kary Mullis; After the 'Eureka,' a Nobelist Drops Out». Статья была посвящена пятилетию вручения Нобелевской премии американскому биохимику Кэри Муллису (Kary Banks Mullis; 28.12.1944 — 07.08.2019). Не вдаваясь в детали публикации, хочется обратить внимание на характеристику, данную инновации автором: «Его изобретение высоко оригинально и значимо, оно фактически разделило биологию на две эпохи: до ПЦР и после ПЦР»¹ (перев. — В.А.Н.).

Трудно себе представить, что после разработки эволюционной теории Ч. Р. Дарвином и открытием законов наследственности Г. И. Менделем в биологии могло произойти что-то не менее грандиозное, способное стать рубежной линией в развитии науки. Изобретение ПЦР (полимеразной цепной реакции) само по себе не обогатило нас новыми знаниями и не подвело теоретическую основу под уже имеющиеся массивы данных, но открыло доселе недостижимые практические возможности для

исследований в различных медико-биологических направлениях. За прошедшие десятилетия ПЦР-исследования настолько прочно вошли в обиход прикладной медицины, что стали одним из незаменимых диагностических методов. Зачастую – едва ли не единственным. Область применения ПЦР-диагностики охватывает широкий спектр исследований от выявления возбудителей инфекционных заболеваний человека до установления генетических причин наследственных и мультифакториальных болезней и идентификации личности в судебной медицине [1–7].

Существует достаточно много учебной и специальной литературы, рассматривающей различные аспекты молекулярно-генетических исследований. Она ориентирована, прежде всего, на подготовленных читателей. Предлагаемый цикл лекций предназначен для учащихся медико-биологических направлений и специалистов, имеющих базовые знания в области биологии. Задача автора – лаконично и без излишней детализации изложить основные концепции и принципы, положенные в основу молекулярно-генетических исследований, осветить важнейшие научно-практические направления их применения, получившие реальное воплощение в повседневной деятельности работника здравоохранения.

Следует оговориться, что молекулярно-генети-

¹ Wade, N. Scientist at Work / Kary Mullis; After the 'Eureka', a Nobelist Drops Out / N. Wade // The New York Times. – 1998. – 15 Sept.

ческие исследования в широком смысле подразумевают использование разнообразных и зачастую чрезвычайно сложных методов изучения генетического материала живых объектов. Далеко не все они стали рутинными и практически значимыми. Так, секвенирование нуклеиновых кислот (НК) чрезвычайно важно для установления нуклеотидной структуры ДНК и РНК и может быть использовано в медицинской практике, например, для выявления новых мутаций, ассоциированных с заболеваниями человека. При этом применение секвенирования для массовой диагностики таких мутаций делает процедуру длительной и/или дорогостоящей [8].

Полимеразная цепная реакция также подразумевает манипуляции с нуклеиновыми кислотами. Однако в данном случае исследователь обычно ограничивается идентификацией специфического участка генома без детального его изучения, что обеспечивает необходимую скорость выполнения анализа в сочетании с простотой и низкой себестоимостью. При этом технологический уровень лабораторного оборудования и требуемая квалификация персонала таковы, что ПЦР-диагностика может быть успешно развернута на базе любого медицинского, образовательного или исследовательского учреждения.

События, связанные с пандемией коронавирусной инфекции COVID-19, в очередной раз показали, что потенциал использования молекулярно-генетической диагностики в медицине далек от исчерпания. Более того, как и в ряде предшествовавших инцидентов, именно ПЦР-диагностика становится «золотым стандартом» при выявлении патогенных микроорганизмов, несмотря на наличие ряда альтернативных исследовательских методов [9–11].

Биологические источники и методы получения нуклеиновых кислот для ПЦР-диагностики

Одним из наименее технологичных, но чрезвычайно важных этапов молекулярно-генетического исследования является получение препаратов нуклеиновых кислот из биологических образцов. К настоящему времени разработаны методики выделения НК практически из любых материалов – от свежих фрагментов тканей до фиксированных препаратов и высушенных образцов [12–17]. Столь же разнообразны и сами способы экстракции НК. Вне зависимости от типа используемого материала универсальным является этап разрушения (лизиса) клеток и клеточных ядер для высвобождения в раствор нуклеиновых кислот. Для этой цели используют мощные детергенты, разрушающие липидный компонент биомембран (например, додецилсульфат натрия), и денатурирующие вещества для дезактивации мембранных и цитоплазматических белков (например, гуанидин тиоцианат).

Дальнейшие манипуляции при выделении НК определяются текущими требованиями к скорости выполнения методики и качеству получаемого препарата. Классическая хлороформ-фенольная экстракция, до сих пор используемая в большинстве научных лабораторий, позволяет получить продукт с высокой концентрацией и степенью очистки НК от примесей (**таблица 1**). При этом большое количество манипуляций увеличивает длительность процедуры и вероятность загрязнения (контаминации) конечного продукта посторонними веществами, в том числе нуклеиновыми кислотами, из других образцов и окружающей среды. Использование летучих и токсичных веществ делает процедуру небезопасной для оператора [16].

Термокоагуляционная экстракция, объединяющая ряд так называемых «экспресс-методов», фактически ограничивается стадией термического лизиса исходного образца и осаждением коагулирующих примесей в присутствии вспомога-

Метод/ Method	Критерий/ Criterion	Производительность/ Throughput	Качество продукта/ Product quality	Риск контаминации/ Risk of contamination	Опасность для здоровья/ Health hazard
Хлороформ-фенольная экстракция Phenol-chloroform extraction		Низкая Low	Высокое High	Высокий High	Высокая High
Термокоагуляционная экстракция Thermocoagulation extraction		Высокая High	Низкое Low	Низкий Low	Низкая Low
Сорбентная экстракция Silica adsorption extraction		Низкая Low	Высокое High	Высокий High	Низкая Low

Таблица 1.

Некоторые методы извлечения нуклеиновых кислот из биологических образцов и критерии их эффективности [15–17].

Table 2.

Techniques of nucleic acid extraction and criteria defining their efficiency [15–17].

тельных реагентов. Преимущества метода – простота и высокая скорость исполнения, что определяется минимумом манипуляций и снижает вероятность контаминации образца. При этом конечный раствор содержит помимо НК различные продукты распада клеток, а также компоненты реакционной смеси. Некоторые из этих веществ являются потенциальными ингибиторами ПЦР, что может повлиять на результат дальнейшего исследования.

Сорбентная экстракция основана на явлении избирательного осаждения нуклеиновых кислот на частицах диоксида кремния, что облегчает удаление прочих примесей в ходе дальнейшей промывки образца. При высоком качестве получаемого продукта выполняется условие безопасности процедуры для оператора и окружающей среды благодаря отсутствию в протоколе токсичных веществ [15–17]. Недостатки методики (значительное количество манипуляций и сопутствующие этому длительность процедуры и высокая вероятность контаминации) в настоящее время удалось преодолеть путем разработки автоматических станций для выделения НК.

Нуклеиновые кислоты – объект изучения при молекулярно-генетическом исследовании

Как следует из определения, молекулярно-генетические исследования подразумевают изучение генетических свойств биологического объекта на молекулярном уровне. Альтернативное название – «генодиагностика» указывает на возможность идентификации и исследования с помощью данных методов отдельных генов (а так-

же некодирующих участков геномов). Таким образом, объектом изучения являются специфические участки ДНК и РНК или целые геномы. Поскольку нуклеиновые кислоты содержат видоспецифическую информацию о каждом живом объекте, в некоторых случаях обнаружение и видовая идентификация нуклеиновой кислоты являются целью исследования, например, при генодиагностике возбудителей инфекционных заболеваний человека [2, 9–11].

Особенностью нуклеиновых кислот, в отличие от белков и некоторых других макромолекул, является отсутствие «узнаваемой» пространственной структуры, присущей только данному биологическому объекту. В задачи генодиагностики входит «прочтение» изучаемого участка НК. Прямое определение нуклеотидной последовательности НК-мишени возможно с помощью ранее упомянутого секвенирования, однако в большинстве случаев приемлемы более простые методы косвенного изучения физико-химических свойств интересующего участка ДНК или РНК.

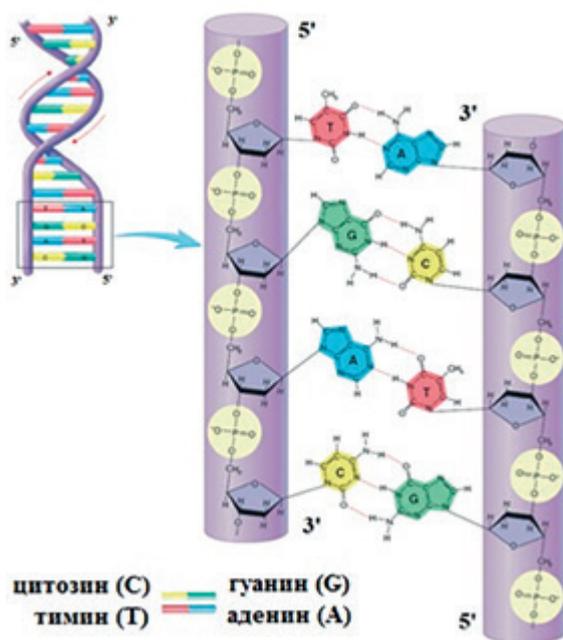
Для того чтобы понять основные принципы такого анализа, прежде всего, следует рассмотреть строение нуклеиновой кислоты (**рисунок 1**).

Как ДНК, так и РНК, являются полинуклеотидами. Каждый нуклеотид, в свою очередь, состоит из трех частей: циклического моносахарида-пентозы (дезоксирибозы или рибозы); азотистого основания, присоединенного к 1'-атому углерода пентозы, и остатка фосфорной кислоты, присоединенного к 5'-атому углерода пентозы. Взаимодействие между нуклеотидами в одной цепи НК осуществляется путем образования фосфодиэфирной связи между 5'-фосфатом предшествующего нуклеотида и одной из ОН-групп пентозы (3'-ОН группой) следующего нуклеотида. Очевидно, что крайние нуклеотиды одной цепи будут нести либо свободную 5'-Ф группу (это 5'-конец НК), либо свободную 3'-ОН группу (это 3'-конец НК) [18].

В отличие от РНК, ДНК образует регулярную двунитевую структуру, образованную антипараллельными полинуклеотидными нитями таким образом, что 5'-конец одной из них располагается напротив 3'-конца другой. Такая конфигурация позволяет компенсировать естественную «скошенность» каждой из нитей ДНК при их сближении, но даже и в этом случае для повышения стабильности ДНК вынуждена принять структуру спирали. При максимальном сближении двух нитей ДНК становится возможным формирование поперечных водородных связей между азо-

Рисунок 1.
Структура ДНК (из [18]).

Figure 1.
DNA structure (from [18]).



тистыми основаниями противолежащих участков. Хотя единичная водородная связь является слабой, большое их количество способно прочно удерживать вместе комплементарные нити ДНК. Обязательным условием эффективного взаимодействия двух цепей является комплементарность оснований. Несоответствие оснований – «мисматч» (от англ. *mismatch* – несоответствие), возникающее например, вследствие мутаций, приводит к локальному снижению стабильности двунитевой структуры [18].

ПЦР как модель естественного механизма репликации ДНК in vitro

Строго говоря, ПЦР не является «изобретением», скорее, это «открытие» природного механизма репликации ДНК, который позднее удалось реализовать вне клетки. В естественных условиях для удвоения ДНК включается целый ансамбль клеточных ферментов и вспомогательных веществ [19–21]. Прежде всего, двунитевая ДНК должна быть разделена на одиночные нити, что осуществляется хеликазой (рисунок 2).

В дальнейшем одиночные нити поддерживаются в свободном состоянии дестабилизирующими белками. В это же время в области расплетения ДНК (репликационная вилка) другой фермент – праймаза на однострессовой ДНК-матрице синтезирует короткую олигонуклеотидную заправку (праймер) для будущей дочерней цепи.

ДНК-полимераза распознает свободную 3'-ОН группу праймера и начинает последовательно присоединять к ней нуклеотиды, комплементарные матрице. Предшественниками нуклеотидов являются дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (дНТФ) четырех типов (дАТФ, дГТФ, дТТФ, дЦТФ), которые одновременно являются и строительным материалом для дочерней цепи, и макроэргами благодаря наличию в своем составе трех фосфатных групп. Направление синтеза дочерней цепи ДНК всегда одно – от 5'-конца к 3'-концу. Для синтеза лидирующей цепи достаточно одного праймера, она образуется непрерывно, следуя за хеликазой. Для построения отстающей цепи требуется множество праймеров, поэтому она синтезируется в виде фрагментов Оказаки, которые позднее будут соединены вместе еще одним ферментом – ДНК-лигазой [19–21].

В ходе ПЦР также осуществляется процесс репликации НК, однако он повторяется многократно, приводит к образованию многочисленных копий целевого участка и потому называется амплификацией. Для генодиагностики обычно выбирается один или несколько относительно

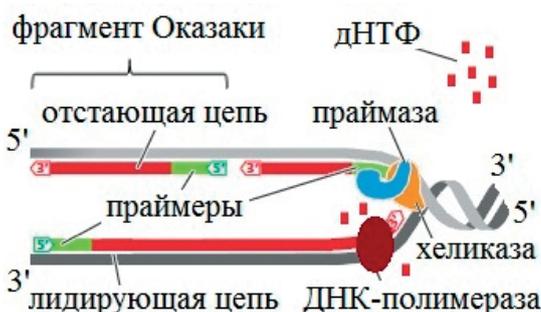


Рисунок 2.
Схема репликации фрагмента ДНК.

Figure 2.
Replication of a DNA fragment.

коротких участков НК, а не весь геном. В систему вводятся искусственные праймеры, комплементарные концам изучаемой области, что автоматически ограничивает участок амплификации (рисунок 3). При этом отпадает необходимость в праймазе. Становится очевидным, что для разработки любой ПЦР-системы необходимы знания о нуклеотидной последовательности НК-мишени.

По этой причине созданию протокола для ПЦР предшествует секвенирование, по крайней мере, концевых частей области НК, которую предполагается амплифицировать [19, 22].

В искусственных условиях довольно сложно обеспечить условия для согласованной работы всех элементов клеточного репликационного ансамбля, поэтому основной задачей при создании ПЦР стало упрощение системы с сохранением ее работоспособности и эффективности. Установлено, что ДНК можно многократно нагревать до температуры более 90°C, что приводит к разрушению водородных связей и разделению нитей (денатурация, или плавление). Последующее охлаждение сопровождается восстановлением двунитевой спирали (ренатурация). Контролируемое

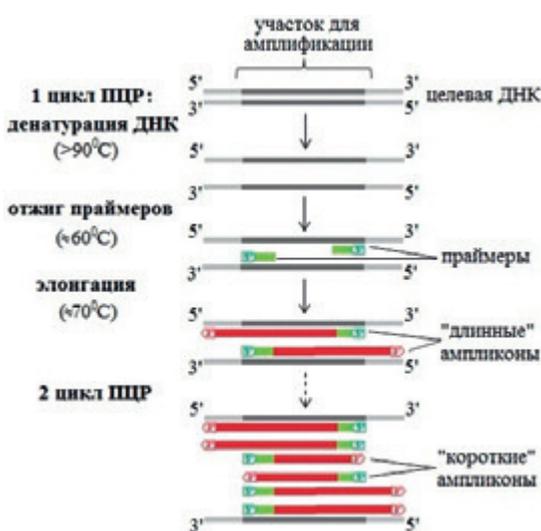


Рисунок 3.
Этапы ПЦР.

Figure 3.
PCR stages.

нагревание-охлаждение системы позволяет избавиться от хеликазы и дестабилизирующих белков на стадии образования однострессовой матрицы. Однако остается еще один элемент системы, заменить или устранить который невозможно, – это ДНК-полимераза.

В условиях постоянного нагревания этот фермент будет подвергаться тепловой денатурации и «выключать» ПЦР. Прошло достаточно много времени с момента открытия ПЦР, прежде чем ученым удалось обнаружить в природе и научиться получать в достаточном количестве термостабильную ДНК-полимеразу. В настоящее время большинство протоколов ПЦР основаны на использовании ДНК-полимеразы из термофильной бактерии *Thermus aquaticus* – Taq-полимеразы, проявляющей максимальную активность при температуре более 70°C и относительно стабильную при более высоких температурах [23, 24].

Таким образом, стандартная ПЦР-система включает единственный фермент – Taq-полимеразу или аналогичный, помещенный в буфер с оптимальными физико-химическими свойствами. Пара искусственных праймеров обеспечивает узнавание и амплификацию специфического участка НК, а дНТФ, как и в клеточной системе, служат материалом будущих копий НК-мишени [19–22].

ПЦР является циклическим процессом. На первом этапе система нагревается до температуры плавления ДНК для образования однострессовой матрицы. Затем ПЦР-смесь охлаждается до 50–60°C. На этом этапе становится возможным формирование водородных связей и присоединение (отжиг) праймеров к комплементарным участкам ДНК. Наконец, на стадии элонгации при температуре около 70°C Taq-полимераза наращивает праймеры до более длинных полинуклеотидов в направлении 5' → 3'. При этом расходуются присутствующие в системе дНТФ.

Продукты амплификации называются ампликонами. В ходе первого цикла ПЦР образуются «длинные» ампликоны, превышающие длину изучаемого участка. Это объясняется отсутствием ограничителя для работы Taq-полимеразы в области образующегося 3'-конца ампликона. В последующих циклах, которые включают те же стадии, что и первый, «длинные» ампликоны, наряду с исходной ДНК, сами становятся матрицами для амплификации. При этом уже со второго цикла в системе появляются «короткие» ампликоны, соответствующие по длине изучаемому участку ДНК. Именно они в дальнейшем будут накапли-

ваться экспоненциально, обеспечивая «цепной» характер ПЦР [19–22].

Остается добавить, что весь процесс ПЦР осуществляется без участия человека. Предварительно подготовленная в микропробирке ПЦР-смесь с внесенным раствором НК (или без нее – на данном этапе это может быть не известно) помещается в амплификатор (термоциклер). Амплификатор по заданной программе осуществляет циклическое изменение температурного режима на протяжении 30–40 циклов, при этом в системе накапливается достаточное для идентификации и исследования количество ампликонов. Современные форматы ПЦР обладают чрезвычайно высокой чувствительностью и способны успешно амплифицировать даже единичные копии исходной НК. Однако коммерческие тест-системы, предназначенные для выявления патогенных микроорганизмов, обычно обладают аналитической чувствительностью от 1000 копий НК в 1 мл исходного клинического образца.

Анализ результата ПЦР – этап детекции

Проведение ПЦР в рамках генодиагностики означает выполнение ключевого, но не завершающего этапа исследования. В ходе процесса в реакционной смеси не происходит видимых изменений, свидетельствующих о накоплении ампликонов. С другой стороны, ампликоны (а также неизрасходованные праймеры) аналогичны небольшим фрагментам двунитевой ДНК, которая могла присутствовать в растворе с момента приготовления смеси. Например, при выявлении микроорганизмов в исходном биологическом образце всегда присутствуют и клетки носителя – человека. На стадии выделения нуклеиновых кислот ДНК человека экстрагируется наряду с НК паразита и неизбежно оказывается в ПЦР-смеси. Таким образом, после проведения ПЦР заключительной задачей является отличить образовавшиеся целевые ампликоны от прочих НК, что и обозначается термином «детекция» [22].

Исторически наиболее ранним и все еще распространенным способом детекции является электрофоретическое разделение НК. Оно базируется на двух основных принципах. Во-первых, НК обладают отрицательным зарядом (за счет фосфатных групп) и потому способны в постоянном электрическом поле двигаться в сторону анода [18]. Во-вторых, подвижность НК в электрическом поле обратно пропорциональна длине (или массе) фрагмента НК. Электрофорез проводят в полужидкой среде (геле) с агарозой или полиакриламидом в качестве связующего вещества, их

концентрация подбирается с учетом предполагаемого размера ампликонов и должна обеспечивать хорошие сортирующие свойства геля [25].

Результат электрофоретического разделения НК оценивается визуально, поэтому необходимо специфическое окрашивание этих макромолекул. Традиционно нуклеиновые кислоты идентифицируют с помощью интеркалирующих красителей, способных связываться почти исключительно с ними за счет встраивания между нуклеотидами параллельно плоскости азотистых оснований. Наиболее распространенными интеркалирующими красителями являются бромистый этидий и SYBR Green, в комплексе с ДНК они дают соответственно красно-оранжевую и зеленую флуоресценцию при УФ-возбуждении. Краситель обычно вводится в состав электрофоретического геля на стадии его приготовления. В процессе движения НК не только разделяются по размеру, но и связываются с красителем. Визуализация результата разделения происходит после завершения процесса путем помещением пластинки геля на трансиллюминатор, содержащий УФ-облучатель [25].

Геномная ДНК обладает достаточно большим размером, чтобы задержаться в стартовых ячейках и обладает небольшой подвижностью (**рисунок 4**).

При наличии в составе исходного образца ДНК-мишени, комплементарной праймерам, продуктом ПЦР становятся ампликоны. Яркость полос ампликонов на электрофореграмме обычно пропорциональна концентрации исходных ДНК-матриц, но для точной количественной оценки этого параметра используются альтерна-

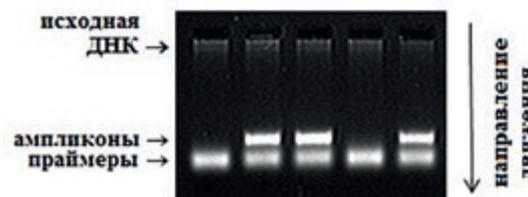


Рисунок 4.

Фрагмент электрофореграммы при детекции результатов ПЦР

Figure 4.

Electrophoretic detection of PCR results

тивные методы анализа, например ПЦР с детекцией «в реальном времени». Наконец, праймеры также способны связываться с красителем и являются как фракция наиболее коротких и наиболее подвижных ДНК-фрагментов.

Завершая анализ теоретических основ проведения генодиагностики, основанной на ПЦР, можно заключить, что данная группа методов направлена, прежде всего, на выявлении искомой последовательности в ДНК или РНК. Для осуществления исследования необходимы знания о нуклеотидном составе данной НК-мишени, на основании которых разрабатываются праймеры для осуществления собственно ПЦР. При ПЦР-амплификации происходит размножение данного участка с использованием в качестве матрицы минимального количества НК, что определяется «цепным» характером ПЦР. При этом достигается высокая специфичность реакции за счет избирательного связывания праймеров с уникальными участками мишени. Идентификация ампликонов в ПЦР-смеси является завершающей стадией генодиагностики. Причем современные модификации ПЦР-анализа позволяют провести как качественный анализ образца с целью выяснения наличия или отсутствия искомой НК, так и количественный анализ для установления ее концентрации.

Литература / References:

- Zhu H, Zhang H, Xu Y, Laššáková S, Korabečná M, Neužil P. PCR past, present and future. *BioTechniques*. 2020;69(4):317-325. <https://dx.doi.org/10.2144/btn-2020-0057>
- Kralik P, Ricchi M. A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything. *Front Microbiol*. 2017;8:108. <https://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.00108>
- Волков А.Н., Хабиева С.М., Смирнова Е.Ю., Ларионов А.Ю. Генодиагностика мутаций UGT1A1 в практике современной медицины. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2018;63(3):186-192 [Volkov AN, Khabieva SM, Smirnova EYu, Larionov AV. The genetic diagnostics of mutations UGT1A1 in practice of modern medicine. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics*. 2018;63(3):186-192. (In Russ.)] <https://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-3-186-192>
- Tong Y, Shen S, Jiang H, Chen Z. Application of digital PCR in detecting human diseases associated gene mutation. *Cell Physiol Biochem*. 2017;43(4):1718-1730. <https://dx.doi.org/10.1159/000484035>
- Волков А.Н., Лошакова Л.Ю. Значение полиморфизма генов человека, участвующих в амелогенезе и формировании микросреды ротовой полости, для развития кариеса зубов. *Медицинская генетика*. 2011;10(2):12-16 [Volkov AN, Loshakova LJ. Polymorphism of human genes involved in amelogenesis and formation of microenvironment in mouth for the development of dental caries. *Medical Genetics*. 2011;10(2):12-16. (In Russ.)]
- Дружинин В.Г., Волков А.Н., Глушков А.Н., Головина Т.А., Минина В.И., Ингель Ф.И., Ларионов А.В., Мейер А.В., Лунина А.А., Толочко Т.А., Ахальцева Л.В., Кривцова Е.К., Юрцева Н.А., Юрченко В.В. Роль полиморфизма генов репарации в оценке чувствительности генома человека к воздействию сверхнормативных концентраций радона. *Гигиена и санитария*. 2011;5:26-30 [Druzhinin VG, Volkov AN, Glushkov AN, Golovina TA, Minina VI, Ingel FI, Larionov AV, Meyer AV, Lunina AA, Tolochko TA, Akhaltseva LV, Krivtso-

- va EK, Yurtseva NA, Yurchenko VV. Role of repair gene polymorphism in estimating the sensitivity of human genome to excess radon concentrations. *Hygiene & Sanitation* (Russian Journal). 2011;5:26-30. (In Russ..)]
7. Cavanaugh SE, Bathrick AS Direct PCR amplification of forensic touch and other challenging DNA samples: A review. *Forensic Sci Int Genet*. 2018;32:40-49. <https://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.10.005>
 8. Petersen B, Fredrich B, Hoepfner MP, Ellinghaus D, Franke A. Opportunities and challenges of whole-genome and -exome sequencing. *BMC Genet*. 2017;18(1). <https://dx.doi.org/10.1186/s12863-017-0479-5>
 9. Waller JV, Kaur P, Tucker A, Lin KK, Diaz MJ, Henry TS, Hope M. Diagnostic tools for Coronavirus disease (COVID-19): Comparing CT and RT-PCR viral nucleic acid testing. *American Journal of Roentgenology*. 2020;215. <https://dx.doi.org/10.2214/AJR.20.23418>
 10. Long C, Xu H, Shen Q, Zhang X, Fan B, Wang C, Zeng B, Li Z, Li X, Li H. Diagnosis of the Coronavirus disease (COVID-19): rRT-PCR or CT? *European Journal of Radiology*. 2020;126:108961. <https://dx.doi.org/10.1016/j.ejrad.2020.108961>
 11. Udugama B, Kadhiresan P, Kozlowski HN, Malekjahani A, Osborne M, Li VYC, Chen H, Mubareka S, Gubbay JB, Chan WCW. Diagnosing COVID-19: The disease and tools for detection. *ACS Nano*. 2020;14(4):3822-3835. <https://dx.doi.org/10.1021/acsnano.0c02624>
 12. Ghatak S, Muthukumar RB, Nachimuthu SK. A simple method of genomic DNA extraction from human samples for PCR-RFLP analysis. *J Biomol Tech*. 2013;24:224-231. <https://dx.doi.org/10.7171/jbt.13-2404-001>
 13. Hue NT, Chan NDH, Phong PT, Linh NTT, Giang NDT. Extraction of human genomic DNA from dried blood spots and hair roots. *Int J Biosci Biochem Bioinforma*. 2012;2(1):21-26.
 14. Khare P, Raj V, Chandra S, Agarwal S. Quantitative and qualitative assessment of DNA extracted from saliva for its use in forensic identification. *J Forensic Dent Sci*. 2014;6(2):81-85.
 15. Волков А.Н. Фиксированные лимфоциты человека как источник ДНК для ПЦР-диагностики. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016;61(12):819-821 [Volkov AN. The fixed human lymphocytes as a source of DNA for polymerase chain reaction diagnostic. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics*. 2016;61(12):819-821. (In Russ..)] <https://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2016-61-12-819-821>
 16. Green MR, Sambrook J. Isolation and quantification of DNA. *Cold Spring Harb Protoc*; 2018. <https://dx.doi.org/10.1101/pdb.top093336>
 17. Katevatis C, Fan A, Klapperich CM. Low concentration DNA extraction and recovery using a silica solid phase. *PLoS ONE*. 2017;12(5):e0176848. <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0176848>
 18. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular biology of the cell*. 6th ed. New York-London: Garland Science Publishing; 2015.
 19. Pierce BA. *Genetics: A conceptual approach*. New York: WH Freeman and Company; 2012.
 20. Браун Т.А. *Геномы*. М.–Ижевск: Институт компьютерных исследований; 2011. [Brown TA. *Genoms 3*. Moscow-Izhevsk : Institut komp'yuternyh issledovaniy; 2007. (In Russ..)]
 21. Кребс Дж., Голдштейн Э, Килпатрик С. *Гены по Льюину*. М.: Лаборатория знаний; 2017 [Krebs JE, Goldstein ES, Kilpatrick ST. *Lewin's Genes X Boston*. Moscow: Laboratorija znaniy; 2011. (In Russ..)]
 22. Li D, Zhang J, Li J. Primer design for quantitative real-time PCR for the emerging Coronavirus SARS-CoV-2. *Theranostics*. 2020;10(16):7150-7162. <https://dx.doi.org/10.7150/thno.47649>
 23. Potapov V, Ong JL. Examining sources of error in PCR by single-molecule sequencing. *PLoS One*. 2017;12(1):e0169774. <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0169774>
 24. Chen S, Zheng X, Cao H, Jiang L, Liu F, Sun X. A simple and efficient method for extraction of Taq DNA polymerase. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2015;18:355-358. <https://dx.doi.org/10.1016/j.ejbt.2015.08.001>
 25. Green MR, Sambrook J. Analysis of DNA by agarose gel electrophoresis. *Cold Spring Harb Protoc*; 2019(1). <https://dx.doi.org/10.1101/pdb.top100388>

Сведения об авторах

Волков Алексей Николаевич, кандидат биологических наук, доцент кафедры биологии с основами генетики и паразитологии; старший научный сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (650056, г. Кемерово, ул. Ворошилова, 22а).

Вклад в статью: написание статьи.

ORCID: 0000-0003-1169-715X

Начева Любовь Васильевна, доктор биологических наук, профессор, заведующая кафедрой биологии с основами генетики и паразитологии ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (650056, г. Кемерово, ул. Ворошилова, 22а).

Вклад в статью: написание статьи.

ORCID: 0000-0002-3148-8788

Статья поступила: 23.09.2020г.

Принята в печать: 30.11.2020г.

Контент доступен под лицензией CC BY 4.0.

Authors

Dr. Alexey N. Volkov, PhD, Associate Professor, Department of Biology, Genetics and Parasitology; Senior Researcher, Central Research Laboratory, Kemerovo State Medical University (22a, Voroshilova Street, Kemerovo, 650056, Russian Federation).

Contribution: wrote the manuscript.

ORCID: 0000-0003-1169-715X

Prof. Lyubov V. Nacheva, MD, DSc, Professor, Head of the Department of Biology, Genetics, and Parasitology, Kemerovo State Medical University (22a, Voroshilova Street, Kemerovo, 650056, Russian Federation).

Contribution: wrote the manuscript.

ORCID: 0000-0002-3148-8788

Received: 23.09.2020

Accepted: 30.11.2020

Creative Commons Attribution CC BY 4.0.