

DOI: <https://doi.org/10.17816/ecogen624820>

Научный обзор



Методы «прогулки по геному» на основе ПЦР (обзор)

Е.С. Окулова^{1, 2}, М.С. Бурлаковский¹, Л.А. Лутова¹¹ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия;² Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург, Россия

АННОТАЦИЯ

В обзоре рассматривается ряд классических и современных методов, позволяющих установить нуклеотидную последовательность неизвестных участков ДНК, фланкирующих известные. Они применяются для расшифровки регуляторных областей генов, определения сайтов встраивания Т-ДНК или вирусов и т. д. в тех случаях, когда использование полногеномного секвенирования неоправданно. Для амплификации участка ДНК, к концу неизвестной последовательности необходимо добавить участок связывания для праймера; это реализуется либо путем лигирования адаптера, либо посадкой вырожденного праймера в мягких условиях, либо закольцовыванием фрагмента ДНК, чтобы изучаемый участок оказался окружен известными последовательностями. Второй важной задачей является избавление от неизбежно возникающих продуктов неспецифического связывания адаптеров либо вырожденных праймеров — чаще всего данная проблема разрешается несколькими раундами вложенной ПЦР. Разные методы существенно отличаются по трудоемкости, распространенности и доступности необходимых реактивов.

Ключевые слова: прогулка по геному; прогулка по хромосоме; ПЦР; фланкирующие последовательности; сайт встраивания; сайт интеграции; Т-ДНК.

Как цитировать

Окулова Е.С., Бурлаковский М.С., Лутова Л.А. Методы «прогулки по геному» на основе ПЦР (обзор) // Экологическая генетика. 2024. Т. 22. № 1. С. 75–103. DOI: <https://doi.org/10.17816/ecogen624820>

DOI: <https://doi.org/10.17816/ecogen624820>

Review

PCR-based genome walking methods (review)

Elena S. Okulova^{1,2}, Mikhail S. Burlakovskiy¹, Ludmila A. Lutova¹¹ Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia;² All-Russian Institute of Plant Protection, Saint Petersburg, Russia

ABSTRACT

The review discusses a range of classical and modern methods used to determine the nucleotide sequence of unknown DNA regions flanking known ones. These methods are applied to decipher the regulatory regions of genes, identify integration sites of T-DNA or viruses, and so on, in cases where the use of whole-genome sequencing is not justified. To amplify a DNA segment, a binding site for a primer must be added to the end of the unknown sequence. This can be achieved either by ligating an adapter or by annealing a degenerate primer under gentle conditions, or by looping the DNA fragment so that the target region is surrounded by known sequences. The second important task is to eliminate the inevitable products of nonspecific binding of adapters or degenerate primers, which is often resolved through multiple rounds of nested PCR. Different methods vary significantly in terms of complexity, prevalence, and the availability of required reagents.

Keywords: genome walking; chromosome walking; PCR; flanking sequences; integration site; T-DNA.

To cite this article

Okulova ES, Burlakovskiy MS, Lutova LA. PCR-based genome walking methods (review). *Ecological genetics*. 2024;22(1):75–103.DOI: <https://doi.org/10.17816/ecogen624820>

Received: 19.12.2023

Accepted: 09.04.2024

Published online: 14.04.2024

ВВЕДЕНИЕ

Ключевой технологией современных наук о жизни, безусловно, является секвенирование, дающее возможность установить последовательность биополимеров, чаще всего нуклеотидную последовательность геномной ДНК. Венец его развития, полногеномное секвенирование, как следует из названия, позволяет получить исчерпывающую информацию об объекте. Однако для многих задач применение подобной «тяжелой артиллерии» неоправданно по причине стоимости, малодоступности и избыточности выдаваемых данных. Большинство рутинных запросов генетики и молекулярной биологии по-прежнему могут быть разрешены с использованием дешевого и доступного секвенирования по Сэнгеру, позволяющего обработать фрагменты ДНК до 1000 пар нуклеотидов за прочтение.

Однако в этом случае на исследователя падает задача предоставить целевой фрагмент ДНК, желателен амплифицированный. Создание и скрининг библиотек геномной ДНК по трудоемкости немногим отличается от подготовки к полногеномному секвенированию; методы на основе ПЦР более простые, быстрые и нетребовательные к ресурсам. Но для проведения ПЦР необходимо подобрать прямой и обратный праймеры, комплементарные обоим концам фрагмента. Таким образом, поиск мутаций в уже известных последовательностях не представляет труда, однако исследование неизученных участков ДНК, даже граничащих с известными, сталкивается с проблемой «курицы и яйца»: для амплификации требуется праймер, подобрать который возможно, только секвенировав данный участок. Излишне упоминать, что это касается значительного спектра задач молекулярной генетики, связанных с анализом неизвестных последовательностей ДНК: расшифровка регуляторных областей генов; амплификация вариабельных последовательностей, окружающих консервативные участки генов; определение сайтов встраивания Т-ДНК, вирусов или транспозонов; заполнение пробелов в полногеномном секвенировании [1], в метагеномном анализе [2, 3].

В подобных случаях, когда доступная генетическая информация ограничена, применяется группа методов, объединенных названием «прогулка по геному» (genome walking, GW), позволяющих амплифицировать неизвестный участок ДНК, граничащий с известной последовательностью. Для этого необходимо добиться связывания праймеров с неизвестным участком ДНК. Классический метод «инвертированной ПЦР» заключается в разрезании ДНК ферментами рестрикции с последующим самолигированием фрагментов в кольцевые структуры. Таким образом, неизвестный фланкирующий участок ДНК оказывается окружен известной последовательностью и может быть амплифицирован с помощью пары специфических к ней праймеров (расположенных в ориентации, обратной классической).

В прочих вариантах «прогулки по геному» к неизвестному участку ДНК присоединяется короткая известная линкерная/адаптерная/кассетная последовательность. Это осуществляется либо путем рестрикции-лигирования, либо с помощью ПЦР с использованием случайных и полуслучайных праймеров, 3'-конец которых связывается с геномной ДНК в мягких условиях отжига, а 5'-конец несет адаптерную последовательность. Для каждого дальнейшего этапа ПЦР используется генспецифический праймер и праймер, комплементарный адаптеру. Таким образом, все методы «прогулки по геному» многие исследователи разделяют на следующие категории: инвертированная ПЦР, опосредованная лигированием ПЦР, ПЦР со случайными праймерами [4]. Авторами был добавлен раздел «другие методы», описывающий подходы к решению проблемы амплификации неизвестной последовательности ДНК, не классифицируемые по трем предложенным группам.

Общей проблемой «прогулки по геному» является необходимость амплификации, по сути, единственной гибридной молекулы ДНК, возникающей в результате удачного события, что обычно разрешается несколькими раундами вложенной ПЦР. Особенно это проявляется в случае инвертированной ПЦР, поскольку для самолигирования требуются специфические условия, включая очень низкую концентрацию исходной ДНК. Использование случайных и полуслучайных праймеров же неизбежно порождает значительный уровень «шума» — помимо целевого продукта ПЦР (фрагмент от генспецифического праймера до адаптерного праймера) возникает подавляющее количество побочных продуктов (результаты «встречной» посадки адаптерных праймеров на геномную ДНК). Каждая методика «прогулки по геному» включает свой способ подавления неспецифической амплификации. Так, на исходном адаптере обычно не может напрямую отжигаться соответствующий праймер; сайт связывания появляется только на комплементарной цепи ДНК, которую синтезирует полимеразы, стартовавшая с генспецифического праймера. В других вариантах адаптер образует структуру шпильки, которая может работать как праймер; образовавшаяся ДНК, в силу большой протяженности самокомплементарного участка, становится практически инертной и не участвует в последующих реакциях амплификации. Для дальнейшего повышения эффективности амплификации целевого фрагмента (и понижения ее для побочных продуктов) температуру отжига генспецифических праймеров подбирают выше, чем для адаптерных праймеров.

В силу вероятностной природы методик «прогулки по геному», успешность эксперимента зависит от множества факторов, и исследователю, скорее всего, придется потратить время на адаптацию протокола к своему объекту. Существенное влияние имеет концентрация матричной ДНК (ее избыток может быть столь же вреден, как и недостаток) и ее качество (короткие праймероподобные

продукты деградации ДНК существенно увеличивают количество побочных продуктов ПЦР). Для секвенирования важна длина получившегося целевого продукта; в случае методов, включающих рестрикцию, она зависит от расположения сайтов узнавания фермента в геноме. Если в ходе реакции появляется несколько продуктов разной длины, преимущественно амплифицируется наиболее короткий. Методы ПЦР со случайными праймерами позволяют в определенных пределах регулировать размер получаемых фрагментов. Ключевое значение имеет температура отжига в цикле низкой жесткости/строгости/точности, когда происходит посадка адаптерных праймеров на геномную ДНК. Повышение температуры снижает вероятность данного события и одновременно увеличивает среднюю длину фрагмента; понижение температуры приводит к появлению более коротких фрагментов и усиливает «шум». Данный параметр проще всего настраивать для получения оптимального результата.

ИНВЕРТИРОВАННАЯ ПЦР

Первым методом, позволившим успешно определить неизвестную последовательность ДНК из известной области *in vitro* стал метод **инвертированной ПЦР (1988 г.)**. Данный подход подразумевает расщепление ДНК рестриктазой, которая не имеет сайта разрезания в интегрируемом участке. Полученные фрагменты закольцовываются лигированием в специальных условиях (с очень низкой концентрацией ДНК). Далее проводится амплификация нужного участка с применением разнонаправленных

праймеров, комплементарных концам известной последовательности. В этом случае не нужны фланкирующие праймеры к растительному участку генома (рис. 1).

Главное из преимуществ метода — высокая специфичность, так как в процессе не используются адаптеры либо вырожденные праймеры. Тем не менее во время применения данного подхода существует низкая вероятность закольцовывания нужного фрагмента по сравнению с перекрестным лигированием. Метод также имеет ограничения из-за неравномерности распределения сайтов рестрикции [5, 6].

ПЦР, ОПОСРЕДОВАННАЯ ЛИГИРОВАНИЕМ

Для ПЦР, опосредованной лигированием, описано несколько различных методов, и все они включают следующие этапы:

1. Рестрикционное расщепление ДНК.
2. Лигирование к концам образовавшихся фрагментов небольших нуклеотидных последовательностей (адаптер/линкер/кассета), содержащих сайт отжига адаптерного праймера.
3. Амплификация пограничного участка с использованием специфических праймеров к целевому участку ДНК и к лигированному фрагменту (рис. 2).

Различия между отдельными методами заключаются в структуре фрагмента лигирования, а также в способе исключения ложноположительных результатов. Рассмотрим некоторые методы из данной группы.

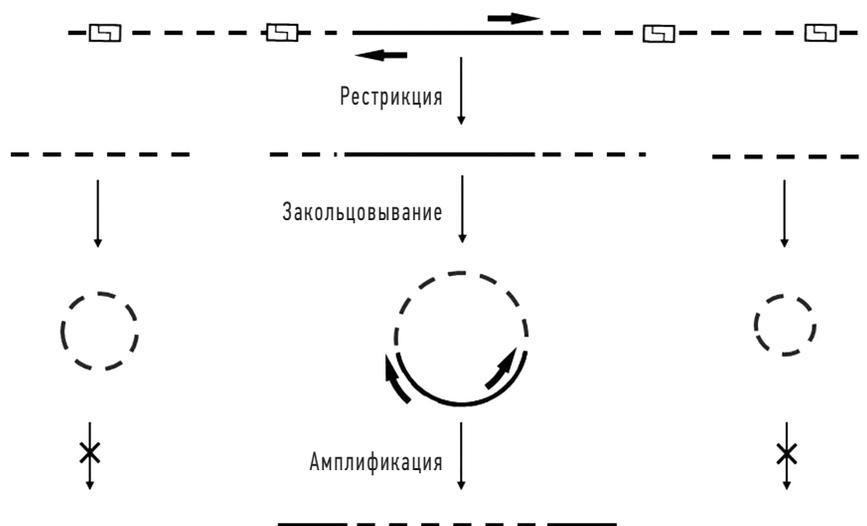


Рис. 1. Схематическое изображение принципа инвертированной ПЦР (на основе Е.К. Хуй и соавт. [6]). Сплошная линия — известная последовательность ДНК; штриховая линия — неизвестный участок ДНК; стрелка — сайт посадки праймера; белые прямоугольники — сайты рестрикции. ДНК расщепляют рестриктазой, которая не имеет сайта разрезания в интегрируемом участке, закольцовывают в условиях, благоприятных для образования мономерных колец и амплифицируют. При ПЦР используют разнонаправленные праймеры, комплементарные концам интегрируемого фрагмента

Fig. 1. Schematic representation of inverted PCR (based on E.K. Hui et al. [6]). Solid line, known DNA sequence; dashed line, unknown DNA segment; arrow, primer binding site; white rectangles, restriction sites. DNA is cleaved by a restriction enzyme that does not have a cutting site within the insert, then circularized under conditions favorable for the formation of monomeric circles and amplified. In PCR, primers complementary to the ends of the insert fragment are used in opposite directions

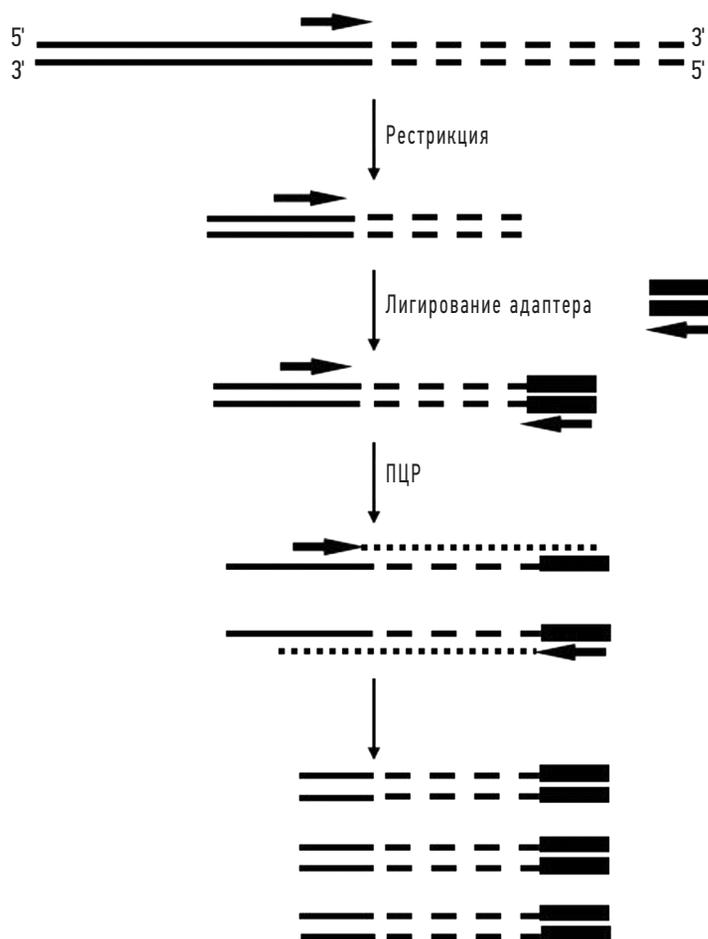


Рис. 2. Схематическое изображение принципа ПЦР, опосредованной лигированием. Сплошная линия — известная последовательность ДНК; штриховая линия — неизвестный участок ДНК; пунктирная линия — продукт амплификации; маленькая стрелка — сайт посадки праймера; черные прямоугольники — адаптер

Fig. 2. Schematic representation of PCR mediated by ligation. Solid line, known DNA sequence; dashed line, unknown DNA segment; dotted line, amplification product; small arrow, primer binding site; black rectangles, adapters

Опосредованная лигированием ПЦР чрезвычайно чувствительна к качеству матричной ДНК и требует выделения высококачественного продукта [7].

«Vectorette»-ПЦР / «пузырьковая» ПЦР (1990 г.) была впервые использована для быстрого выделения терминальных последовательностей из клонов искусственной хромосомы дрожжей (YAC) [8]. «Vectorette»-ПЦР позволяет проводить амплификацию последовательностей ДНК, которые находятся между известным праймером и ближайшим сайтом рестрикции.

ДНК расщепляется рестриктазой с образованием липкого 5'-конца. К 5'-концу лигируется линкер «vectorette». Проводится амплификация целевого фрагмента. При ПЦР используется праймер, специфический для ДНК-мишени, и праймер, специфический для «vectorette». Кассеты «vectorette» состоят из двухцепочечной последовательности с центральной некомplementарной областью и липким концом, подходящим для лигирования ДНК, расщепленной ферментами рестрикции. Праймер к «vectorette», используемый в ПЦР, имеет ту же последовательность,

что и несовпадающая часть одной из цепей и, следовательно, не может отжигаться и инициировать элонгацию до тех пор, пока ее комплементарная цепь не будет синтезирована полимеразой от специфического праймера ДНК-мишени (рис. 3).

Кассеты «vectorette» состоят из двухцепочечной последовательности с центральной некомplementарной областью (образующей структуру, похожую на пузырьки) и липким концом, подходящим для лигирования ДНК, расщепленной ферментами рестрикции. Праймер к «vectorette», используемый в ПЦР, имеет в точности ту же последовательность, что и несовпадающая часть одной из цепей адаптера, и, следовательно, не может отжигаться и инициировать элонгацию до тех пор, пока комплементарная цепь не будет синтезирована полимеразой от специфического праймера ДНК-мишени [8].

Главный недостаток метода — низкая специфичность: возможно образование побочных продуктов в результате неспецифического отжига любого из праймеров и в результате реакции так называемой концевой репарации.

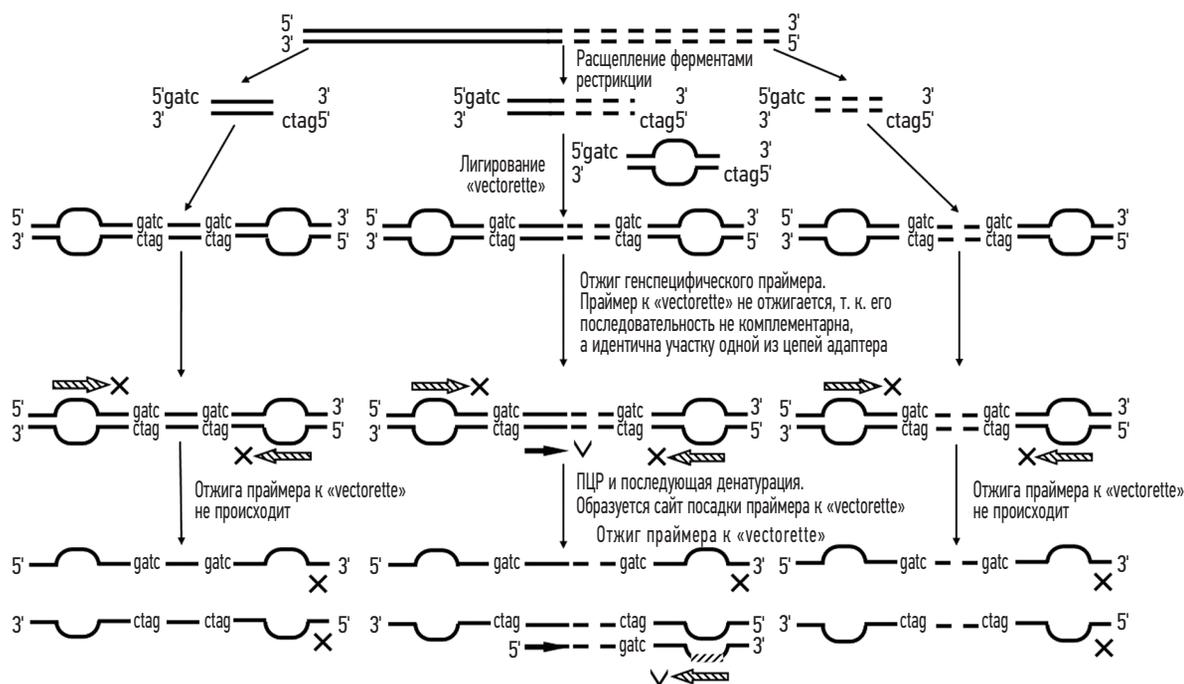


Рис. 3. Схематическое изображение принципа «vectorette PCR» (на основе Е.К. Hui и соавт. [6]). Сплошная линия — известная последовательность ДНК; штриховая линия — неизвестный участок ДНК; заштрихованная стрелка — сайт посадки праймера к «vectorette»; заштрихованный участок — фрагмент ДНК, комплементарный праймеру к «vectorette»; черная стрелка — сайт посадки праймера к ДНК-мишени. ДНК расщепляется рестриктазой с образованием липкого 5'-конца. Затем к 5'-концу лигируется синтетический олигонуклеотид (линкер), называемый «vectorette». ПЦР-амплификацию фрагмента ДНК проводят с использованием внутреннего праймера, специфического для ДНК-мишени, и праймера, специфического для «vectorette»

Fig. 3. Schematic representation of the “vectorette PCR” (based on E.K. Hui et al. [6]). Solid line, known DNA sequence; dashed line, unknown DNA segment; hatched arrow, primer binding site to the “vectorette”; hatched segment, DNA fragment complementary to the “vectorette” primer; black arrow, primer binding site to the target DNA. DNA is cleaved by a restriction enzyme, generating a 5'-sticky end. Then, a synthetic oligonucleotide (linker) called “vectorette” is ligated to the 5'-end. PCR amplification of the DNA fragment is performed using an internal primer specific to the target DNA and a primer specific to the “vectorette”

Это происходит из-за того, что в растворе остаются нелигированные кассеты и продукты рестрикции с липкими 5'-концами. Эти концы достраиваются во время первого цикла реакции ПЦР, а после последующей стадии денатурации способны отжигаться друг с другом, образуя достаточно стабильные структуры, работающие как праймеры.

«Splinkerette»-ПЦР (1995 г.) имеет аналогичный механизм, что и «vectorette»-ПЦР, но позволяет исключить побочные продукты амплификации. Вместо центрального несовпадающего участка ДНК-кассеты «vectorette», кассета «splinkerette» включает в себя структуру со «шпилькой» на одной из цепей (рис. 4). Праймер имеет последовательность, аналогичную некомплементарному участку адаптера, противоположному «шпильке», и поэтому, как и в случае «vectorette», не может отжигаться до тех пор, пока не будет синтезирована комплементарная цепь. В реакции ПЦР шпильчатая структура сработает как праймер, и полимеразы начнут удлинение вдоль нижней цепи. Образовавшаяся «гигантская шпилька» стабильна и функционально исключается из дальнейшей реакции. Хотя во время денатурации шпильчатая структура «распрямляется», когда температура падает, она снова принимает форму шпильки быстрее, чем с ней успевают связаться праймеры, из-за большой длины комплементарных

последовательностей, температура плавления которых выше, чем у любого праймера. Следовательно, она не может быть «затравкой» для сшивания концов. Кроме того, в системе «splinkerette» только одна из цепей может выступать в качестве неспецифического праймера, тогда как в системе «vectorette» и верхняя, и нижняя цепь может вызвать неправильную элонгацию.

Преимущества «splinkerette» перед «vectorette» особо проявляются в амплификации более крупных фрагментов, где образование целевого продукта может быть затруднено из-за усиления конкуренции со стороны артефактов, возникающих в результате «концевой репарации» [5, 9].

ПЦР с захватом (Capture PCR, CPCR, 1991 г.) также предполагает использование адаптеров, которые лигируются к липким концам геномной ДНК, расщепленной рестриктазами, при этом лигируемые конструкции не восстанавливают сайт рестрикции. В олигонуклеотидных адаптерах отсутствуют 5'-фосфатные группы, что обеспечивает ковалентное присоединение только одного из олигонуклеотидов к концам фрагментов геномной ДНК. Длинный 25-нуклеотидный адаптер можно использовать вместе с одним из трех различных коротких комплементарных олигонуклеотидов для модификации концов, генерируемых более чем 30 различными ферментами

рестрикции. Короткие олигонуклеотиды имеют низкое содержание GC, гарантирующее, что они не будут работать как праймеры в ходе ПЦР.

Нить ДНК элонгируется с использованием 5'-биотинилированного праймера, комплементарного известной последовательности ДНК. Таким образом синтезируется новая цепь, меченная биотином, что позволяет в дальнейшем фиксировать этот фрагмент на покрытой стрептавидином твердой подложке. Полученные в результате элонгации участки включают интересующий фрагмент ДНК и заканчиваются последовательностью, комплементарной добавленному линкеру. Фрагменты, меченные биотином, закрепляются на покрытой стрептавидином твердой подложке. После промывок проводится ПЦР, в которой в качестве матрицы используются данные последовательности, связанные с носителем. Второй специфический праймер, комплементарный области ниже биотинилированного олигонуклеотида, используется в качестве праймера для ПЦР вместе с линкерным олигонуклеотидом. Полученный в результате ПЦР-продукт содержит интересующий участок ДНК (рис. 5).

Удобство СPCR значительно повышается за счет использования специальной подложки с магнитными шариками, покрытыми стрептавидином, помещающимися в отдельные лунки титрационного микропланшета. Процедура позволяет одновременно выделять фрагменты из большого количества образцов ДНК и сводит к минимуму риск загрязнения между реакциями. Этот метод очень специфичен. Более того, при использовании твердофазного секвенирования не требуется процедура клонирования [10].

Несмотря на то что реакции рестрикции и лигирования проводятся одновременно, процесс может усложниться из-за необходимости использования стрептавидиновых гранул, проведения дополнительных двух раундов ПЦР и процедуры очистки матрицы перед секвенированием, поскольку не в каждой лаборатории практикуется работа со стрептавидином и биотином [11].

Метод ПЦР с отбором продуктов по биотиновому тегу (**Extension primer tag selection PCR, EPTS/LM-PCR, 2001 г.**) по сути является усовершенствованным методом ПЦР с захватом. Его особенность состоит в том, что он позволяет исключить нецелевые фрагменты ДНК с помощью специальных биотинилированных праймеров на этапе, предшествующем твердофазной ПЦР.

На первом этапе EPTS/LM-PCR с помощью рестриктаз получают небольшие двухцепочечные фрагменты и, чтобы сформировать тупые концы, амплифицируют с обратным биотинилированным праймером. Далее концентрируют биотинилированную ДНК на спин-колонке и удаляют лишние праймеров. Биотинилированные фрагменты иммобилизуются на магнитных шариках (с целью удаления нецелевой ДНК и компонентов реакции) и фиксируются на стенке пробирки с помощью концентратора (процессора) магнитных частиц.

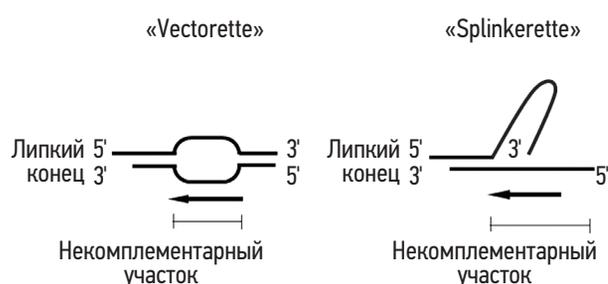


Рис. 4. Схематическое изображение структур касет «vectorette» и «splinkerette» (на основе E.K. Hui и соавт. [6])

Fig. 4. Schematic representation of the structures of «vectorette» and «splinkerette» cassettes (based on E.K. Hui et al. [6])

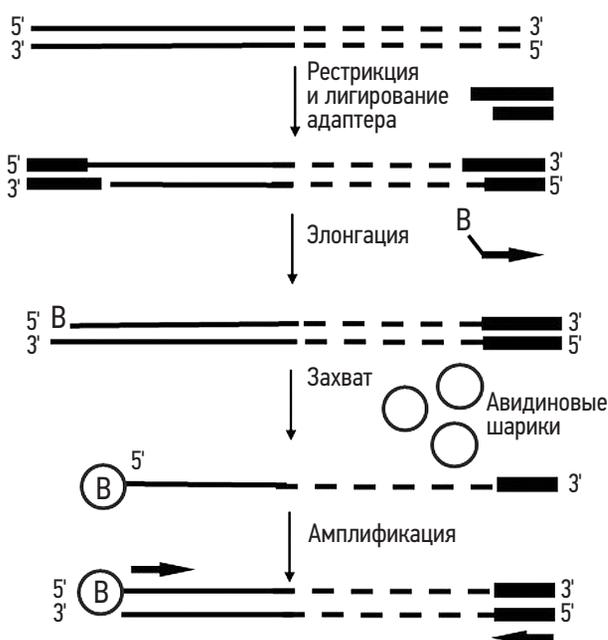


Рис. 5. Схематическое изображение принципа ПЦР с захватом (CPCR) (на основе M. Lagerstrom и соавт. [10]). Сплошная линия — геномная ДНК; черные прямоугольники — адаптер; стрелка — сайт посадки праймера; B — биотин. Первая цепь синтезируется на основе одного генспецифического биотинилированного праймера, что позволяет зафиксировать этот фрагмент на покрытой стрептавидином подложке. Немеченная ДНК удаляется в ходе промывки. Целевой фрагмент амплифицируют с праймером к адаптеру и вторым специфическим праймером

Fig. 5. Schematic representation of the Capture PCR (CPCR) (based on M. Lagerstrom et al. [10]). Solid line, genomic DNA; black rectangles, adapters; arrow, primer binding site; B, biotin. The first strand is synthesized using a single gene-specific biotinylated primer, enabling the fixation of this fragment on a streptavidin-coated substrate. Unlabeled DNA is removed during washing. The target fragment is then amplified with a primer to the adapter and a second specific primer

На втором этапе проводят твердофазную LM-ПЦР: сначала производят лигирование олигонуклеотидной касеты по тупым концам биотинилированных фрагментов (лигирование останавливают этапом промывки).

С помощью последующей щелочной денатурации и воздействия концентратора магнитных частиц отделяют свободную одноцепочечную неботионилированную ДНК. Далее проводят экспоненциальную ПЦР-амплификацию этих фрагментов. В первой амплификации используют внешний кассетный праймер и праймер к известной последовательности ДНК, во второй — внутренний кассетный праймер и другой генспецифический праймер (это позволяет увеличить специфичность метода). Таким образом, образуются фрагменты, включающие границу с неизвестной последовательностью ДНК (Приложение 1, doi: 10.17816/ecogen624820-4200622) [12].

Метод «**Panhandle**»-ПЦР (1992 г.) подразумевает образование кольцевой структуры ДНК с длинным концом («сковорода с ручкой»), содержащей границу известной и неизвестной последовательности (Приложение 2, doi: 10.17816/ecogen624820-4200624). Матрица создается расщеплением геномной ДНК рестрикционными ферментами с последующим лигированием одноцепочечного олигонуклеотида. Полученные фрагменты дефосфорилируют щелочной фосфатазой с целью предотвращения самолигирования. Проводится лигирование фосфорилированного олигонуклеотида к 3'-концу. Этот одноцепочечный олигонуклеотид имеет две особенности: его 5'-конец комплементарен одноцепочечным концам геномной ДНК, расщепленной ферментами рестрикции, а его последовательность гомологична части интегрированного фрагмента.

Проводится денатурация и внутрицепочечный отжиг с образованием кольцевой структуры с длинным концом. В структуре кольца оказывается неизвестная последовательность. Далее с помощью двух пар вложенных праймеров амплифицируется фрагмент, содержащий неизвестный участок [13].

Метод «**boomerang**»-PCR (1995 г.) получил свое название из-за способа, при котором полимераза начинает элонгацию цепи с определенного участка отжига праймера, затем делает петлю вокруг другой цепи и, в конечном итоге, возвращается к исходному фрагменту на ДНК, формируя новый сайт посадки того же праймера. Образование петли происходит благодаря адаптерам, которые сконструированы специальным образом: они имеют самокомплементарные концы и некомплементарную среднюю часть. Технология позволяет использовать разные варианты адаптеров, которые, в зависимости от фермента рестрикции, могут иметь конструкцию, лигирующуюся как к липким, так и к тупым концам расщепленной ДНК (Приложение 3, doi: 10.17816/ecogen624820-4200626). Амплификация целевых фрагментов при ПЦР приводит к наработке определенного продукта, содержащего границу известной и неизвестной последовательности ДНК, который затем можно клонировать и секвенировать [14].

Минусом данного метода является значительное количество ложноположительных результатов, поскольку каждый случай связывания праймера с неспецифическим сайтом порождает фрагмент,

способный амплифицироваться наравне с целевым. Эта проблема может быть решена несколькими раундами вложенной ПЦР с рядом последовательно расположенных праймеров.

ПЦР со специфическим лигированием Т-линкера (T-linker-specific ligation PCR, T-linker PCR, 2003 г.) представляет собой ПЦР с лигированием Т-линкера для «прогулки» по хромосомам или генам. На первом этапе добавляется поли(dT)_n к 3'-концам молекул геномной ДНК с помощью терминальной дезоксиинуклеотидилтрансферазы (TdT). Это необходимо для избегания неспецифического связывания с адаптерами в дальнейшем. Далее проводится расщепление ДНК с поли(dT)_n-последовательностью рестрикционными ферментами, образующими 3'-выступающие концы без А. На следующем этапе происходит удлинение цепи молекулы-мишени с использованием специфического праймера S1 и образование «хвоста» с А на 3'-конце с помощью TaqДНК-полимеразы. С использованием ДНК-лигазы T4 лигируется Т-линкер специально на 3'-конце молекулы-мишени. Далее следуют два раунда вложенной ПЦР для амплификации целевой молекулы: в первом раунде используется пара внешних праймеров S1 и W1, на втором — пары праймеров S2-W2 и S3-W2. При этом идентификация специфически амплифицированных молекул происходит по разнице длин ($\Delta S2-S3$) продуктов S2-W2 и S3-W2 (рис. 6) [15].

ПЦР с лигированием адаптера (2007 г.) подразумевает добавление к липким концам фрагментов рестрикции специального двухцепочечного адаптера с длинным и коротким плечами. При этом 3'-конец короткого плеча занят аминокислотной группой, чтобы предотвратить амплификацию цепи ДНК во время ПЦР. Последовательность короткого плеча адаптера не содержит сайта отжига адаптерного праймера, но более длинное плечо содержит последовательность из 22 нуклеотидов, которая ему точно соответствует. Второй праймер соответствует известной последовательности ДНК: с него будет синтезирована комплементарная цепь, содержащая сайт посадки праймера, специфического для адаптера. Таким образом образуются фрагменты с двумя необходимыми сайтами отжига праймеров (Приложение 4, doi: 10.17816/ecogen624820-4200627) [16].

Еще один заслуживающий внимания метод — ПЦР с удлинением сайта рестрикции (RSE-PCR, 2010 г.). При его применении не проводится лигирования какой-либо последовательности, здесь используется адаптерный праймер, который позволяет удлинить сайт рестрикции (Приложение 5, doi: 10.17816/ecogen624820-4200628) [17].

При применении метода ПЦР с блокированием матрицы (Template-blocking PCR, 2010 г.) с целью уменьшения неспецифической амплификации 3'-концы фрагментов геномной ДНК, расщепленных рестрикционными ферментами, блокируют дидезоксиинуклеозидтрифосфатом (ddNTP) и лигируют с правильно сконструированными кассетами без фосфатной группы на 5'-конце.

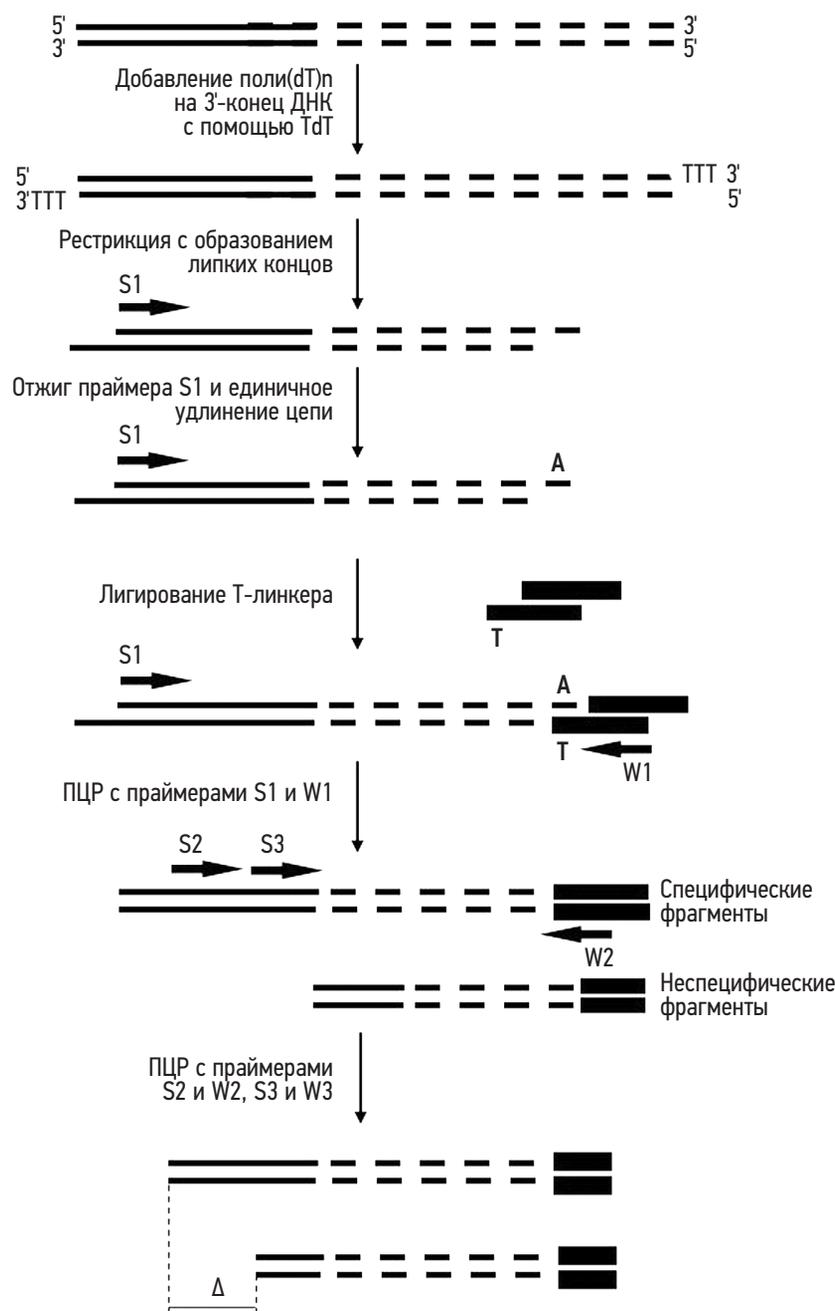


Рис. 6. Схематическое изображение принципа T-linker ПЦР (на основе Y. Yuanxin и соавт. [15]). Сплошная линия — известная последовательность ДНК; штриховая линия — неизвестный участок ДНК; стрелка — сайт посадки праймера; черные прямоугольники — линкер; S1, S2 и S3 — специфические праймеры, связывающиеся с известной последовательностью молекулы-мишени; W1 и W2 — шагающие праймеры, связывающиеся с последовательностью T-линкера; A — A-«хвост» молекулы-мишени; T — T-нуклеотид T-линкера; Δ — предполагаемая разница в продуктах амплификации со специфическими праймерами S2 и S3 в разделенных реакциях второго цикла

Fig. 6. Schematic representation of the T-linker PCR (based on Y. Yuanxin et al. [15]). Solid line, known DNA sequence; dashed line, unknown DNA segment; arrow, primer binding site; black rectangles, linker; S1, S2, and S3, specific primers binding to the known sequence of the target molecule; W1 and W2, walking primers binding to the T-linker sequence; A, A-“tail” of the target molecule; T, T-nucleotide of the T-linker; Δ, presumed difference in amplification products with specific primers S2 and S3 in separate reactions of the second cycle

Такой подход предотвращает нежелательную амплификацию фрагмента, не содержащего целевой последовательности, полученного в результате рестрикции и лигирования кассеты. Модифицированные фрагменты геномной ДНК, фланкированные кассетами, используют в качестве матрицы для амплификации гена-мишени

с генспецифическим праймером и кассетным праймером (Приложение 6, doi: 10.17816/ecogen624820-4200629) [18].

В текущую группу также можно отнести **single specific primer PCR (SSP-PCR, 1989 г.)**, или «однонаправленный genome walking». Несмотря на то что вместо линкеров в данном случае предлагается использовать клонирующий

вектор, этот метод не имеет принципиальных отличий от методов ПЦР, опосредованной лигированием адаптеров.

Для амплификации фрагмента, содержащего границу известной и неизвестной последовательностей ДНК необходима информация только о небольшом участке ДНК для подбора генспецифического праймера.

Метод включает следующие этапы:

- рестриктирование хромосомной ДНК одним или комбинацией ферментов;
- лигирование фрагментов в любой клонирующий вектор;
- амплификацию специфического лигированного фрагмента с использованием одного праймера, специфического для известной области, и второго — общего праймера, гибридизирующегося с вектором.

Достаточно много фрагментов лигируется с векторной ДНК, и вектор-специфический праймер будет гибридизоваться со всеми фрагментами. Для отбора целевых продуктов используется генспецифический праймер, позволяющий экспоненциально накапливаться нужным фрагментам, содержащим сайт посадки данного праймера (Приложение 7, doi: 10.17816/ecogen624820-4200630). В отличие от стандартных методов работы с геномными библиотеками, в этом случае ПЦР проводят вскоре после трансформации, не разделяя бактериальные клоны на отдельные культуры, несущие индивидуальные копии плазмид, что экономит время.

Поскольку SSP-PCR допускает случайную комбинацию рестрикционных ферментов, она позволяет амплифицировать ДНК, для которой нет информации о сайтах рестрикции [19].

ПЦР СО СЛУЧАЙНЫМИ ПРАЙМЕРАМИ

Группа методов ПЦР со случайными праймерами подразумевает использование наборов неспецифических праймеров, способных произвольным образом связываться на молекулу ДНК во время ПЦР. Эта категория не требует сложных манипуляций с ДНК до или после ПЦР. Как правило, данные методы подразумевают чередование циклов с высокой и низкой температурой отжига. В первичной ПЦР требуется цикл с более мягкими условиями, чтобы увеличить вероятность посадки «прогулочных» праймеров на неизвестной последовательности ДНК.

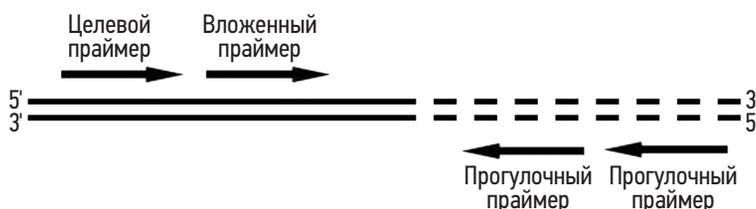


Рис. 7. Общая схема расположения праймеров при ПЦР со случайными праймерами. Сплошная линия — известная последовательность ДНК; штриховая линия — неизвестный участок ДНК; стрелки — сайты посадки праймеров

Fig. 7. The general scheme of primer placement in PCR with random primers. Solid line, known DNA sequence; dashed line, unknown DNA segment; arrows, primer binding sites

Затем следуют 2–3 раунда вложенной ПЦР с жесткими условиями для более эффективного отжига сайтспецифических праймеров. Данные циклы проводятся с целью экспоненциальной амплификации целевых фрагментов и отсеивания ложных результатов (рис. 7). Разница в методах данной группы заключается в структуре «прогулочных» праймеров, а также в количестве и способах чередования циклов с разными условиями отжига.

Часть методов подразумевает процессы самолигирования исследуемой последовательности ДНК и образования кольцевых структур (например, метод UFW). Основным ограничением этих методов является избыточное накопление нецелевых ДНК-продуктов в результате неспецифического отжига случайного праймера [1].

Одним из первых был описан метод ПЦР с целевой прогулкой по геному (Targeted gene walking PCR, 1991 г.). Метод основан на наблюдении, что праймер может инициировать элонгацию либо на неизвестной, либо на специфической последовательности-мишени, которая имеет лишь частичную гомологию с 3'-концом.

В данном подходе используются три вида праймеров: «целевые», которые гибридизуются с конкретной известной последовательностью-мишенью; «внутренние» ^{32}P -меченые детектирующие праймеры, которые расположены на небольшом расстоянии внутри по отношению к «целевым» праймерам ПЦР, и «прогулочные», для гибридизации с неизвестными последовательностями.

Общий протокол «ПЦР с прогулкой по геному» состоит из трех последовательных этапов:

1) серия ПЦР-реакций с идентичными компонентами в каждой пробирке (включая «целевой» праймер), кроме разных «прогулочных» праймеров;

2) на аликвоте из каждой ПЦР-реакции проводят отбор целевых фрагментов с использованием вложенных внутренних ^{32}P -меченых праймеров и праймеров к известной последовательности. Эта процедура позволяет идентифицировать фрагменты, которые содержат участки «целевой» ДНК;

3) меченую полосу вырезают из геля, повторно амплифицируют и прямо секвенируют.

Чтобы увеличить частоту положительных результатов, обычно берут целую серию «прогулочных» праймеров (не менее 20). Хотя реакции с «прогулочными» праймерами проводятся параллельно, сам процесс может быть достаточно трудоемким [20].

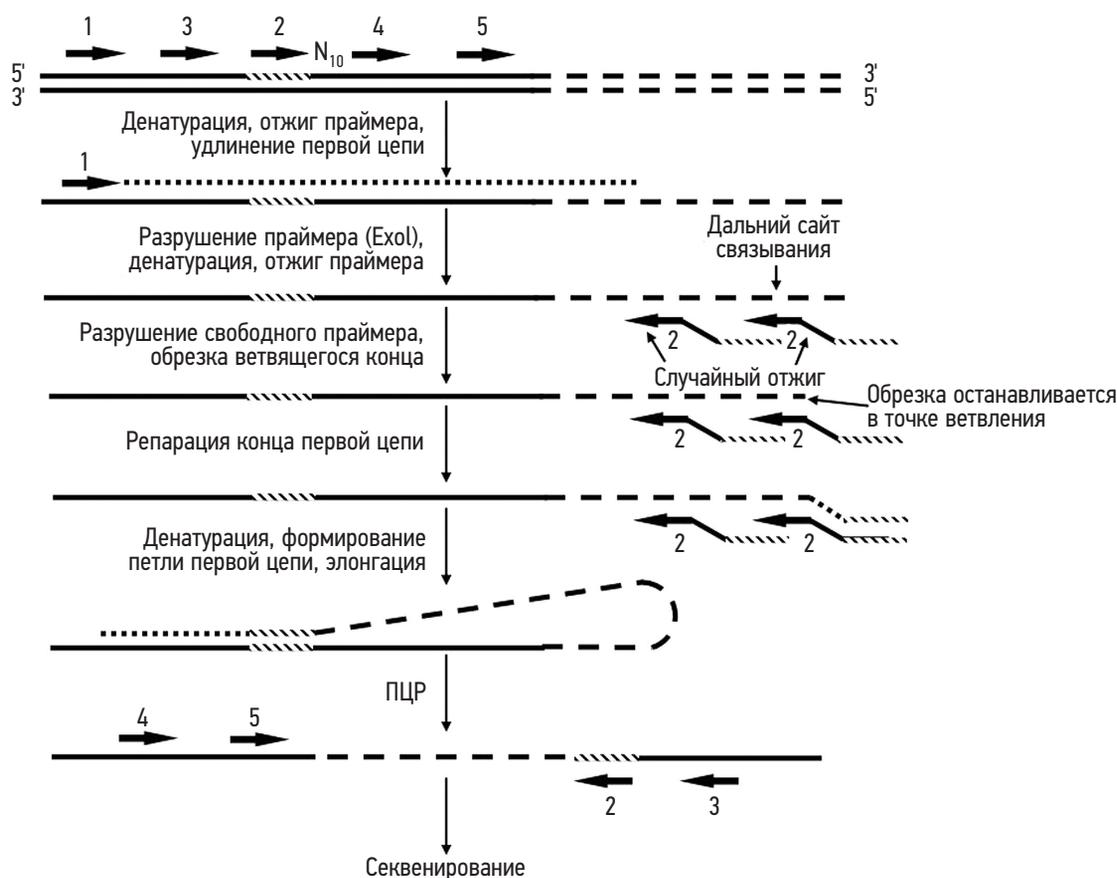


Рис. 8. Схематическое изображение принципа метода UFW (на основе K.W. Myrick и W.M. Gelbart [21]). Сплошная линия — известная последовательность ДНК; штриховая линия — неизвестный участок ДНК; пунктирная линия — продукт амплификации; короткие стрелки с числами — праймеры UFW, пронумерованы в порядке использования

Fig. 8. Schematic representation of the UFW method (based on K.W. Myrick and W.M. Gelbart [21]). Solid line, known DNA sequence; dashed line, unknown DNA segment; dotted line, amplification product; short arrows with numbers, UFW primers, numbered in the order of use

При ПЦР сайта рестрикции (RSPCR, 1993 г.) вместо «прогулочных» праймеров используются последовательности олигонуклеотидов (RSO), которые специфичны участку ДНК, содержащему сайт узнавания рестриктазами (Приложение 8, doi: 10.17816/ecogen624820-4200631). Авторы метода ссылаются на то, что последовательности сайтов рестрикции встречаются повсеместно во всех организмах и повторяются так часто, что теоретически всегда будет сайт рестрикции (начиная с любого участка) в пределах диапазона ПЦР. Теоретически использование RSO может представлять проблему в связи с тем, что они не являются уникальными последовательностями и не обеспечивают достаточной специфичности при ПЦР. Для увеличения специфичности проводится вложенная ПЦР. С этой же целью продукт этой ПЦР секвенируют путем геномной амплификации с секвенированием транскриптов (GAWTS) с другим внутренним праймером к известной последовательности [11].

Особенность метода универсальной быстрой «прогулки по геному» (universal fast walking, UFW, 2002 г.) заключается в том, что вся процедура представляет собой 5–6-часовую серию реакций, проводимых в одной пробирке по одной программе термоцикла (рис. 8).

Метод начинается с синтеза первой цепи с последующим разрушением праймера № 1 экзонуклеазой. Затем нити денатурируют и отжигают с праймером № 2, который содержит случайный участок на 3'-конце, а 5'-конец имеет комплементарный фрагмент к известной последовательности ДНК.

Вторая экзонуклеаза одновременно разрушает не связавшийся праймер и обрезает первую цепь в точке начала случайного 3'-конца (в точке «ветвления») самого дальнего связавшегося праймера № 2. Формирование последовательности на 3'-конце первой цепи идет за счет 5' (неслучайной) части праймера № 2. Цепи снова денатурируют.

Первая цепь образует петлю путем внутрицепочечного отжига между комплементарным участком отжига праймера № 2 и его копией на другом конце последовательности. Далее идет элонгация данной цепи после петли вдоль самой себя. Таким образом на выходе получается продукт, содержащий известные последовательности по краям и неизвестный участок в центре.

Вложенные праймеры № 3 и 4, сайты отжига которых расположены по обеим сторонам от участка отжига праймера № 2, позволяют получить специфический ампликон,

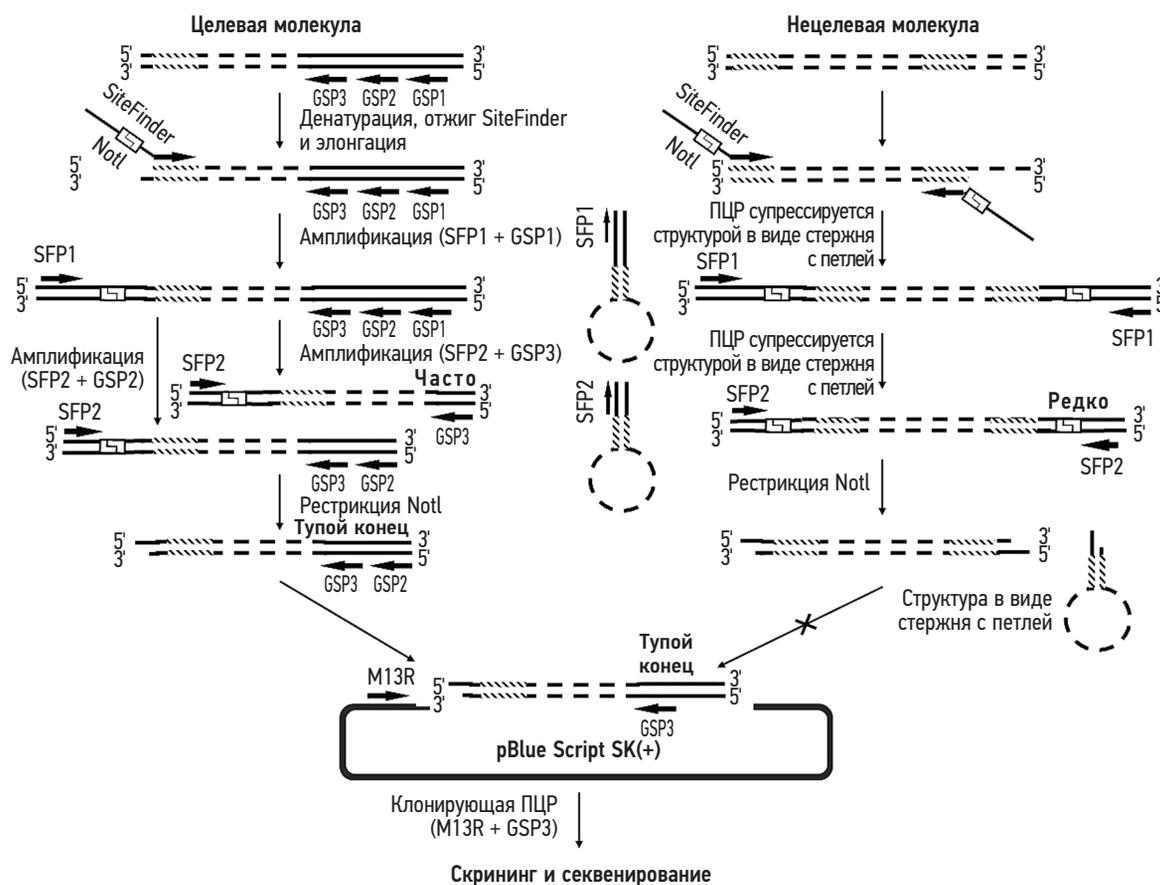


Рис. 9. Схематическое изображение принципа метода ПЦР SiteFinding (на основе G. Tan и соавт. [22]). Сплошная линия — известная последовательность ДНК; штриховая линия — неизвестный участок ДНК; стрелка — сайт посадки праймера; белый прямоугольник — сайт рестрикции; GSP — генспецифические праймеры, SFP — праймеры SiteFinding

Fig. 9. Schematic representation of the SiteFinding-PCR method principle (based on G. Tan et al. [22]). Solid line: known DNA sequence; dashed line: unknown DNA segment; arrow: primer binding site; white rectangle: restriction site; GSP: gene-specific primers, SFP: SiteFinding primers

содержащий границы известной и неизвестной последовательностей [21].

Диапазон действия этого метода напрямую связан с возможностями полимеразы.

В методе **SiteFinding (SiteFinding-PCR, 2005 г.)** при ПЦР используются «ложные» праймеры SiteFinder с известной последовательностью в 4 нуклеотида на 3'-конце и содержащие редкий сайт рестрикции для NotI, что облегчает клонирование с использованием обычно используемых векторов: 5'-...GCGGCCGNNNNNGCCT-3' и 5'-...GCGGCCGNNNNNGCGC-3', вложенные праймеры к ним (SFP1 и SFP2) и 3 генспецифических праймера к известному участку (GSP) (рис. 9).

Сначала проводят реакцию SiteFinding: низкотемпературный отжиг с помощью SiteFinder с образованием сайта рестрикции NotI. В желаемом варианте в результате данной реакции образуются фрагменты, включающие границу известной и неизвестной ДНК и имеющие сайты рестрикции NotI и сайт посадки праймеров SFP1 и GSP1. Далее следует вложенная ПЦР: ДНК-мишень экспоненциально амплифицируется с помощью вложенной ПЦР с GSP и праймерами SFP1 и SFP2. Поскольку процесс посадки

праймеров случаен, возможно образование нецелевых двухцепочечных продуктов, содержащих сайты посадки SFP на обоих концах. Тогда дальнейшая амплификация супрессируется из-за образования структур «стержень – петля» ввиду присутствия инвертированных концевых повторов (в дальнейшем данная последовательность не участвует в реакции). На следующем этапе продукты амплификации SFP-GSP подвергаются расщеплению с помощью NotI и очищаются во время электрофоретического разделения в агарозном геле. В итоге получают молекулы-мишени с одним липким (в сайте рестрикции) и одним тупым концом, что облегчает лигирование таких фрагментов в линеаризованный вектор pBluescript SK(+). Продукты рестрикции с двумя липкими концами или в виде структуры «стержень – петля» не могут быть введены в вектор. Далее происходит клонирование данного фрагмента.

Для скрининга клонов используется внутренний специфический праймер (GSP3) — это гарантирует, что будут отобраны только те клоны, которые содержат специфический продукт, поскольку только молекулы-мишени обладают комплементарным сайтом для GSP3 [22].

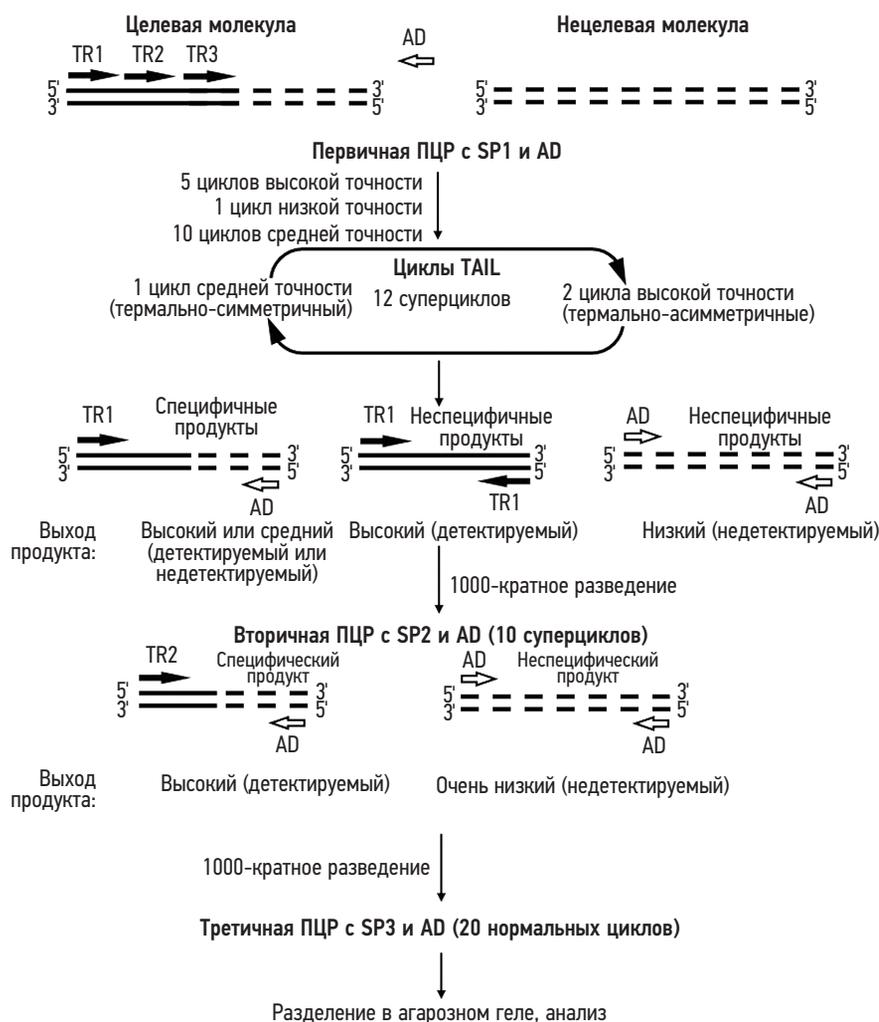


Рис. 10. Схематическое изображение принципа метода TAIL-PCR (на основе Y.-G. Liu и соавт. [23]). Сплошная линия — известная последовательность ДНК; штриховая линия — неизвестный участок ДНК; стрелка — сайт посадки праймера; TR1, TR2, TR3 — вложенные праймеры, комплементарные известной последовательности; AD — короткие произвольные вырожденные праймеры (15–16 п. н.) с низкой температурой плавления и различной степенью вырожденности. Чередую температуру отжига от высокой (62 до 68 °C) в циклах высокой точности до низкой (44 °C) в циклах низкой точности, термически контролируется относительная эффективность амплификации специфических и неспецифических продуктов

Fig. 10. Schematic representation of the TAIL-PCR method (based on Y.-G. Liu et al. [23]). Solid line, known DNA sequence; dashed line, unknown DNA segment; arrow, primer binding site; TR1, TR2, TR3, nested primers complementary to the known sequence; AD, short arbitrary degenerate primers (15–16 bp) with low melting temperature and varying degrees of degeneracy. Alternating annealing temperatures from high (62 to 68 °C) in high stringency cycles to low (44 °C) in low stringency cycles thermally controls the relative efficiency of amplification of specific and nonspecific products

Широко применяется метод **термической асимметричной чересстрочной ПЦР (TAIL-PCR, 1995 г.)**. Он подразумевает использование набора вложенных специфических к известной последовательности праймеров (TR1, TR2, TR3) наряду с короткими произвольными вырожденными (AD) праймерами (15–16 п. н.) с низкой температурой плавления и различной степенью вырожденности. Чередую температуру отжига от высокой (62–68 °C) до низкой (44 °C), можно термически контролировать относительную эффективность амплификации специфических и неспецифических продуктов.

Реакции TAIL-PCR должны проводиться в последовательном порядке: первичная, вторичная и третичная, в которых продукт одной реакции используется в качестве матрицы для следующей реакции (рис. 10).

Первичная реакция производится в шести реакционных пробирках, содержащих геномную ДНК, праймеры, комплементарные известной последовательности, и различные вырожденные праймеры. Продукт первичной ПЦР используется в качестве матрицы для вторичной реакции. Используются аналогичные компоненты, за исключением праймера TR1, который заменяется на праймер TR2, расположенный дальше от 5'-конца. Третичная реакция использует продукт ПЦР вторичной реакции в качестве матрицы и третий вложенный праймер (TR3) с теми же шестью праймерами AD, которые используются в первичной и вторичной реакциях.

Таким образом, TAIL-PCR требует 12 реакций ПЦР для идентификации одного сравнительно небольшого

участка. Возможны также ложноположительные результаты вследствие амплификации артефактов в процессе ПЦР [23, 24].

Вложенная интегрированная ПЦР со слитыми праймерами (Fusion primer and nested integrated PCR, FPNI-PCR, 2011 г.) подразумевает использование специального набора праймеров:

1) праймеры, специфические для известной последовательности ДНК;

2) фьюжн-праймеры (слитые праймеры, составные праймеры, FAD, FP), один участок которых представляет собой вырожденную последовательность (AD), а другой комплементарен праймерам следующих этапов.

Именно сочетание во фьюжн-праймерах известной последовательности и вырожденной отличает этот метод от TAIL-PCR (Приложение 9, doi: 10.17816/ecogen624820-4200637).

На первом этапе готовят большой объем смеси ДНК, генспецифического праймера (SP1), предназначенного для области генома с известной последовательностью, и комбинации 9 произвольных вырожденных фьюжн-праймеров. Амплификации включают от 3 до 6 повторений двух циклов с более жесткими условиями отжига, за которыми следует цикл с более мягкими условиями. Теоретически одноцепочечные продукты ПЦР с генспецифического праймера генерируются во время циклов с высокой температурой отжига, а двухцепочечные продукты с использованием FP-праймеров (FP) получаются во время цикла с более мягкими условиями (температура плавления FP-праймеров существенно ниже, чем SP). На данном этапе возможно образование большого количества неспецифических продуктов.

На втором и третьем этапах проводят вложенную ПЦР с использованием праймеров, специфических для мишени (SP2/SP3 соответственно) и праймеров, специфических для FP (FSP1/FSP2 соответственно). Эти этапы представляют собой ПЦР с высокой температурой отжига, способствующей селективной амплификации целевых последовательностей. Кроме того, большая шпилька, образующаяся в некоторых неспецифических продуктах, также способствует предотвращению их дальнейшей амплификации (подавление ПЦР).

Таким образом, неспецифические продукты, полученные на первом этапе ПЦР в FPNI-PCR не амплифицируются на втором и третьем этапах и существенно разбавляются в конечной смеси [25].

ПЦР на основе частично перекрывающихся праймеров (Partially overlapping primer-based PCR, POP-PCR, 2015 г.) представляет собой еще один метод «прогулки по геному». В нем используется набор относительно длинных праймеров POP, частично перекрывающихся на 3'-конце: POP1 для первичной ПЦР, POP2 для вторичной ПЦР, POP3 для третичной ПЦР. Праймеры имеют произвольные последовательности и содержат идентичные 3'-концы из 10 пар оснований и гетерологичные 5'-концы длиной 15 пар оснований. Эта частично перекрывающаяся конструкция

гарантирует, что праймеры POP отжигаются с комплементарным сайтом друг друга только при относительно низких температурах. В качестве генспецифических используются вложенные праймеры. Всего проводится три раунда ПЦР (первичная, вторичная, третичная). Каждый раунд состоит из трех стадий отжига: стадия 1 — пять циклов высокой жесткости (65 °C), стадия 2 — один цикл низкой (25 °C) пониженной жесткости (50 °C), стадия 3 — 30 циклов высокой жесткости (65 °C). В каждом следующем раунде в качестве матрицы используются продукты предыдущей. Продукты последнего раунда ПЦР содержат наиболее специфические фрагменты, включающие границу известной и неизвестной последовательности ДНК (рис. 11).

POP-PCR — достаточно эффективный метод, но требующий большого количества вырожденных «прогулочных» праймеров, что усложняет экспериментальные операции [26].

Поэтапная ПЦР на основе частично перекрывающихся праймеров (Stepwise partially overlapping primer-based PCR, SWPOP-PCR, 2018 г.) представляет собой усовершенствованную технологию POP-PCR. Основным недостатком POP-PCR, по мнению авторов, является необходимость использования отдельного праймера POP в каждом раунде ПЦР, что усложняет эксперимент и приводит к ошибкам амплификации.

Ключевым моментом стратегии поэтапной ПЦР на основе частично перекрывающихся праймеров является разработка усовершенствованного набора перекрывающихся праймеров, у которых 3'-конец (10 п. н.) последующего праймера SWPOP идентичен 5'-концу предыдущего, следовательно, отжиг между праймером SWPOP и его частично комплементарным сайтом (предыдущий сайт SWPOP) возникает только при относительно низкой температуре (Приложение 10, doi: 10.17816/ecogen624820-4200638) [4].

J. Levano-Garcia (2005 г.) с соавторами предложили метод картирования сайтов вставки транспозонов с помощью тачдаун-ПЦР с использованием пары праймеров, один из которых представляет собой гибридный консенсусно-вырожденный олигонуклеотид, а другой — специфический по последовательности праймер, который отжигается только с одной из цепей вставленного маркерного гена. Последовательность генспецифического праймера подбирают таким образом, чтобы отжиг 3'-конца на известном участке ДНК происходил близко с целевой неизвестной геномной последовательностью, предпочтительно на расстоянии 40–60 п. н. от границы.

Гибридные праймеры разрабатываются в соответствии со стратегией метода CODEHOP [27] и могут представлять собой любой 25–43-мерный олигонуклеотид, имеющий невырожденную консенсусную последовательность на 5'-конце (13–31 п. н.), за которой следует последовательность 10 п. н. с вырожденными основаниями в разных положениях внутри этого сегмента, за которыми следуют 2 п. н. на 3'-конце, которые являются невырожденными [28].

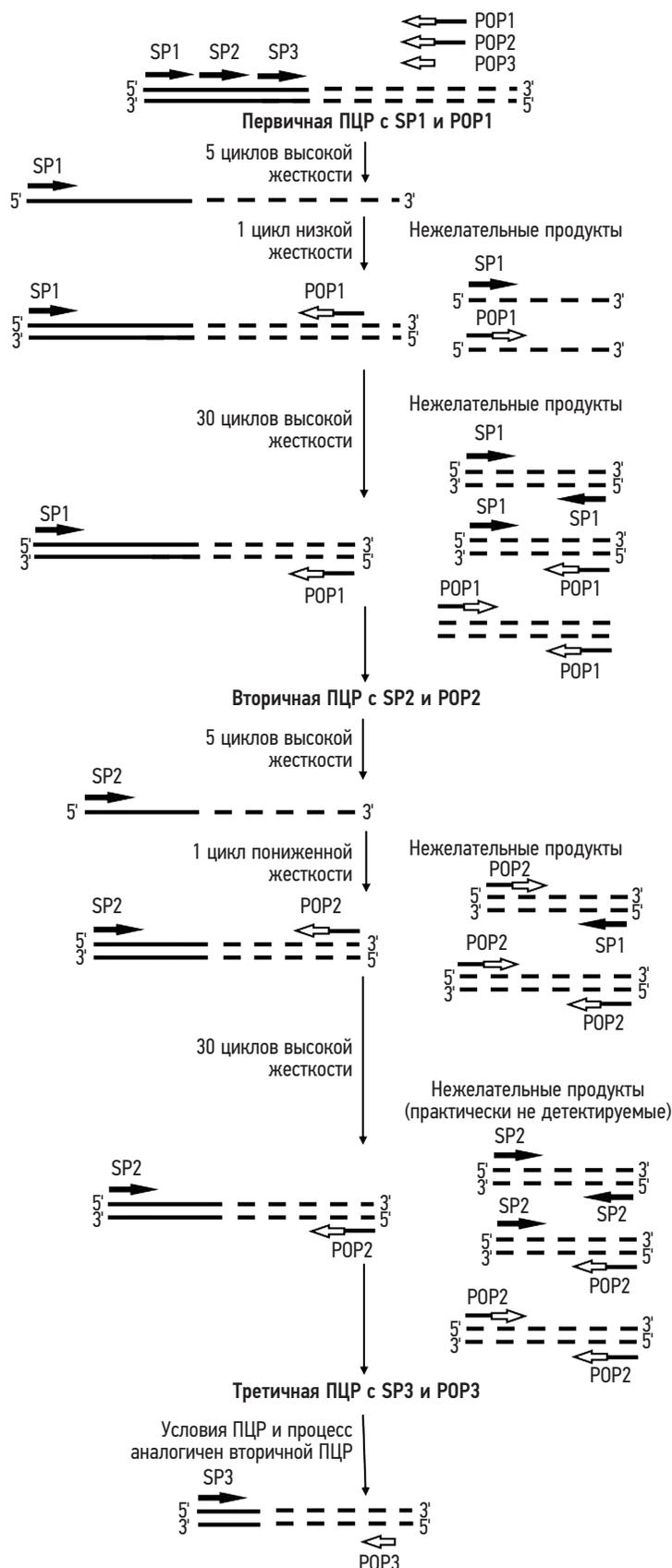


Рис. 11. Схематическое изображение принципа метода POP-PCR (на основе H. Li и соавт. [26]). Сплошная линия — известная последовательность ДНК; штриховая линия — неизвестный участок ДНК; стрелка — сайт посадки праймера
Fig. 11. Schematic representation of the POP-PCR (based on H. Li et al. [26]). Solid line, known DNA sequence; dashed line, unknown DNA segment; arrow, primer annealing site

Метод ПЦР, ориентированной на палиндромную последовательность (*palindromic sequence targeted PCR, PST-PCR, 2021 г.*), основан на нацеливании прогулочных праймеров на палиндромные последовательности, произвольно присутствующие в природных ДНК-матрицах.

PST-PCR включает два раунда ПЦР. В первом раунде используется комбинация одного специфического для последовательности праймера (SSP) с полуслучайным праймером, нацеленным на палиндромную последовательность (PST). Во втором раунде используется комбинация одного или двух универсальных праймеров: один отжигается с 5'-хвостом, присоединенным к специфическому к последовательности праймеру, а другой — отжигается с другим 5'-хвостом, присоединенным к праймеру PST (Приложение 11, doi: 10.17816/ecogen624820-4200639).

Ключевое преимущество PST-PCR состоит в удобстве использования единого универсального праймера с неизменной последовательностью в GW-процессах с использованием различных матриц [7].

Особенностью ПЦР с одиночным длинным праймером и праймером для случайной амплификации полиморфной ДНК (*single-long primer and randomly-amplified polymorphic DNA primer PCR, SLRA PCR, 2019 г.*) является использование одиночного длинного (30–35 п. о.) праймера SLP, имеющего сайт отжига на известной последовательности. SLP-ПЦР позволяет амплифицировать известный участок генома в направлении к границе с неизвестной последовательностью. Далее с помощью серии вложенных ПЦР с тремя генспецифическими праймерами GSP (26–28 п. о.) и случайно амплифицирующими полиморфную ДНК праймерами RAPD (10 п. о.) происходит отсев неспецифических фрагментов. Новизна подхода заключается в использовании длинных праймеров и в одинаково высокой температуре при отжиге и элонгации во время вложенных ПЦР (Приложение 12, doi: 10.17816/ecogen624820-4200640) [29].

В основанной на фьюжн-праймерах ПЦР с образованием структуры в форме ракетки (*Fusion primer driven racket PCR, FPR-PCR, 2022 г.*) используется трифункциональный фьюжн-праймер, слитый с двумя специфическими для последовательности фрагментами, образующимися в ходе первичной ПЦР. Трехфункциональный праймер опосредует прогулку, селективную амплификацию и внутрицепочечный отжиг ДНК-мишени.

FPR-PCR включает два раунда ПЦР: первичную и вторичную. Первичная ПЦР начинается с пяти циклов умеренной жесткости (55 °C), которые позволяют 3'-концу фьюжн-праймера (FP) гибридизоваться только с его сайтом отжига в известной области (SSP1) для увеличения количества копий первой цепи. Последующий одиночный цикл с низкой строгостью (25 °C) помогает фьюжн-праймеру частично отжигаться в неизвестной области этой цепи и элонгироваться в направлении известной области для получения целевой второй цепи, формируя его инвертированный повтор. Затем целевая ДНК экспоненциально

амплифицируется в следующих строгих (65 °C) цикла. Частично одноцепочечная ДНК подвергается внутрицепочечному отжигу между сайтом SSP3 и его инвертированным повтором. В результате образуется конструкция в форме ракетки, в которой неизвестная одноцепочечная область ограничивается известной двухцепочечной «ручкой».

Вторичная ПЦР представляет собой вложенную ПЦР с праймерами SSP2 и SSP4 для экспоненциальной амплификации ДНК-мишени. Любые нецелевые ДНК не могут быть амплифицированы из-за отсутствия идеального сайта связывания с этими двумя праймерами. Целевая ДНК становится основным продуктом реакций (Приложение 13, doi: 10.17816/ecogen624820-4200641) [1].

В *wristwatch PCR (2022 г.)*, так же как и в POP-PCR, используется набор частично перекрывающихся праймеров WWP. Отличие заключается в структуре олигонуклеотидов: праймеры *wristwatch* имеют 5'- и 3'-перекрывающиеся участки и гетерологичный интервал, таким образом при отжиге образуется конструкция, напоминающая по форме наручные часы или пузырек. Отжиг праймеров таким образом возможен при достаточно низких температурах (40 °C). Праймеры WWP также имеют высокую температуру плавления (60–65 °C) и равномерное распределение четырех оснований (A, T, C и G). Последовательность каждого WWP случайна.

Wristwatch PCR состоит из трех вложенных (первичной, вторичной и третичной) ПЦР, в каждой из которых используется свой праймер WWP и ген-специфические праймеры GSP, позволяющие амплифицировать границу известной и неизвестной последовательности ДНК (Приложение 14, doi: 10.17816/ecogen624820-4200644) [30].

ДРУГИЕ МЕТОДЫ

В данную группу были отнесены методы, в которых используется иной подход, нежели в предыдущих двух.

В 1999 г. был предложен **независимый от рестрикции метод клонирования сегментов геномной ДНК за пределами известных последовательностей**, который включает в качестве первого шага элонгацию генспецифического праймера, методологию, обычно применяемую в исследованиях РНК. Это метод, фактически, представляет собой первый этап синтеза кДНК и обычно известен как «5'-быстрая амплификация концов кДНК» (**5'-RACE**) [31].

Метод не зависит от разрезания или картирования рестрикционными ферментами. Он основан на свойстве терминальной трансферазы присоединять цепочку цитозинон на 3'-конец ДНК. На начальном этапе создается одноцепочечная ДНК, покрывающая фланкирующую область путем линейной амплификации с одним праймером в известной области. С помощью терминальной трансферазы добавляется гомоолигомерный цитозиновый «хвост». Затем удлиненные фрагменты амплифицируются с помощью ПЦР с вложенным генспецифическим праймером в известной области. В качестве обратного используется

Метод амплификации геномных шаблонов по типу «катящегося кольца» для инвертированной ПЦР (rolling circle amplification of genomic templates for inverse PCR, RCA-GIP, 2010 г.) основан на создании кольцевых фрагментов геномной ДНК с последующей амплификацией с использованием ДНК-полимеразы $\phi 29$, характеризующейся повышенной процессивностью, без необходимости присоединения линкерных последовательностей.

ДНК расщепляется различными рестриктазами в разных пробирках, затем фрагменты соединяются лигазой T4 для получения кольцевых ДНК. Далее кольцевая ДНК амплифицируется с использованием ДНК-полимеразы $\phi 29$ и гексамерных праймеров. Праймеры отжигаются на матрице и элонгируются. Когда полимеразы $\phi 29$ встречает на своем пути двухцепочечный участок ДНК, она вытесняет вторую цепь и продолжает элонгацию. Замещенный новосинтезированный участок служит местом посадки новых праймеров и становится матрицей. Формируется структура, напоминающая ветвистое дерево, где на каждой ветви происходит синтез. Таким образом образуется большое количество линейных конкатемеров, подходящих для матрицы инвертированной ПЦР, которые можно легко амплифицировать, секвенировать или клонировать, что позволяет одновременно картировать 3'- и 5'-неизвестные концы практически неограниченного числа геномных последовательностей (рис. 12) [36].

4SEE (2020 г.) основан на секвенировании нового поколения и позволяет выявить местоположение большого

числа трансгенных вставок в геноме за одно применение, а также описать связанные с данным событием сложные хромосомные перестройки. Обычно полногеномное секвенирование не учитывает ситуации, когда гетерологичные вставки нарушают целостность как растительной ДНК, так и самого интегрируемого фрагмента, в связи с чем идентификация сайта встраивания становится затруднительной. Подход 4SEE опирается на метод захвата конформации хромосом (3C) [37], который картирует зоны контакта хромосом только на основе молекулярных методов и основывается на принципе лигирования сближенных в пространстве молекул ДНК.

На первом этапе производится обработка клеток формальдегидом для сохранения нативной структуры ядра. При этом происходит фиксация белок-белковых, белок-ДНК, ДНК-ДНК и других взаимодействий посредством образования ковалентных связей между близко расположенными органическими молекулами. На следующем этапе после разворачивания поперечных связей с помощью обработки рестриктазами осуществляют фрагментацию ДНК, а затем проводят лигирование фрагментов ДНК в условиях сильного разбавления для повышения вероятности автолигирования молекул.

Далее продукты ДНК-лигирования дополнительно обрабатываются с образованием кольцевых структур путем второго рестриционного расщепления. Неизвестная ДНК, связанная с известной последовательностью, амплифицируется с помощью инвертированной ПЦР и секвенируется. Результаты секвенирования сравниваются

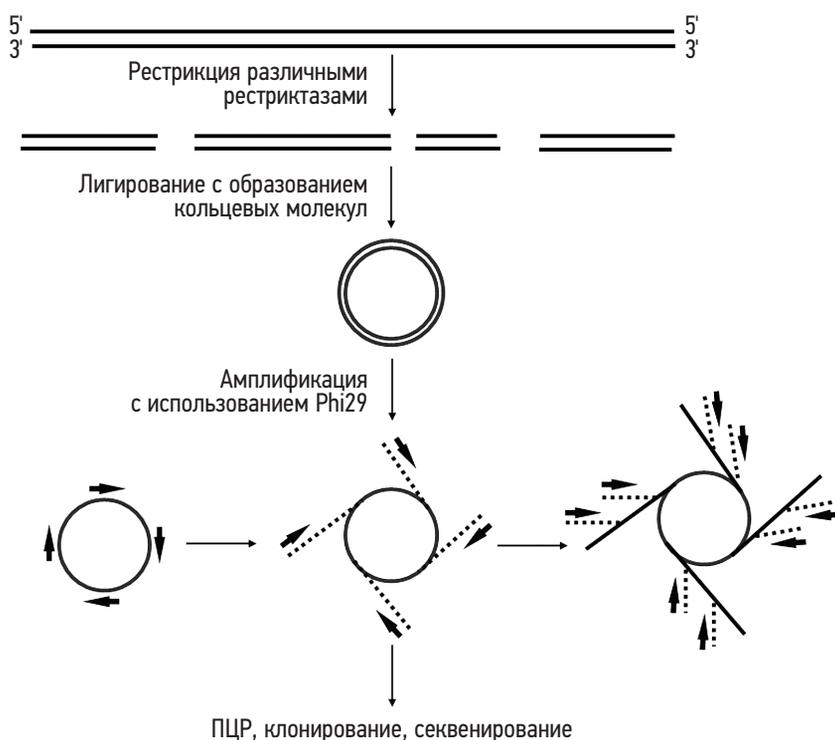


Рис. 12. Схематическое изображение принципа RCA-GIP (на основе A. Tsiftaris и соавт. [36]). Черная линия — геномная ДНК; стрелки — случайные гексамерные праймеры; пунктирные линии — копии конкатемеров

Fig. 12. Schematic representation of the RCA-GIP method (based on A. Tsiftaris et al. [36]). Black line, genomic DNA; arrows, random hexameric primers; dotted lines, copies of concatamers

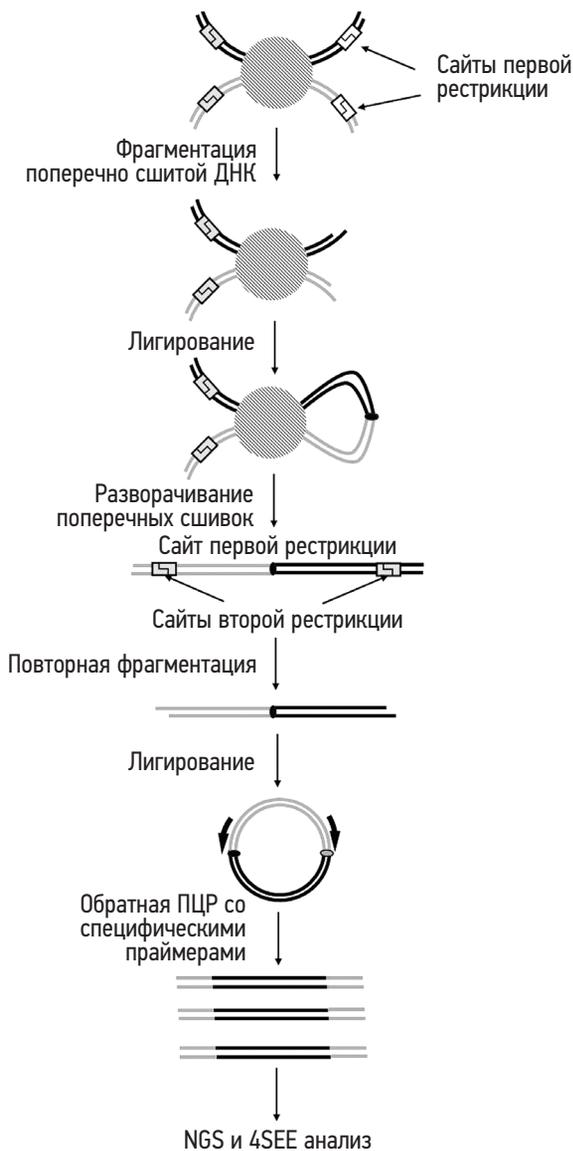


Рис. 13. Схематическое изображение принципа 4SEE. Заштрихованный круг — область сшивки ДНК формальдегидом; серая линия — последовательность известной ДНК; черная линия — неизвестный участок ДНК; белые и серые прямоугольники — сайты рестрикции

Fig. 13. Schematic representation of the 4SEE principle. Shaded circle, DNA crosslinking region with formaldehyde; gray line, known DNA sequence; black line, unknown DNA segment; white and gray rectangles: restriction sites

гомоолигомерный полигуаниновый праймер, комплементарный цитозиновому хвосту в неизвестной области. Он содержит на 5'-конце последовательность «АТАТ», позволяющую в дальнейшем лигазонеzависимо включить полученные молекулы ДНК в Т-вектор с помощью так называемого ТА-клонирования [32] и секвенировать (Приложение 15, doi: 10.17816/ecogen624820-4200645). Данный метод был впервые успешно применен для бактериального генома [33]. Позднее описаны результаты адаптации подхода к картированию границы известной и неизвестной последовательности на основе 5'-RACE и для ДНК эукариотических организмов [34, 35].

с ДНК-библиотеками, проводится биоинформатический анализ полученных результатов. Отмечено, что полимерные свойства генома обеспечивают высокую частоту контактов между линейно соседними последовательностями. Таким образом, вычисляя относительное обогащение библиотеки специфических районов генома, лигированных друг с другом, можно сделать вывод о вероятности взаимодействий этих районов в трехмерном пространстве ядра (рис. 13) [38].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За минувшие десятилетия были предложены десятки методов «прогулки по геному», основанные на различных механизмах. Все они доказали свою функциональность, так что исследователь, желающий расшифровать неизвестную последовательность ДНК, фланкирующую известную, может выбирать метод исходя из доступных реактивов и навыков (см. таблицу).

Теоретически, идеальная система «прогулки по геному» должна:

- включать только широко распространенные методы (например, ПЦР) без модификаций (например, добавление реагентов в процессе ПЦР);
- использовать только «обычные» реактивы (стандартные полимеразы, праймеры длиной до 50 п. н. без радиоактивных и прочих меток);
- проходить в один этап;
- образцы должны быть сразу пригодны для секвенирования.

Ни одна из существующих систем не удовлетворяет требованиям полностью, но многие современные методики вплотную к этому приближаются. Так, методы, основанные на ПЦР, требуют только праймеров (это один из самых дешевых и легкодоступных реактивов) и термостатизирующего амплификатора — базового оборудования генетической лаборатории. Единственным недостатком является необходимость проведения нескольких стадий вложенной ПЦР с разными праймерами.

К методам, повышающим трудоемкость, можно отнести процедуры лигирования последовательностей и работы с не общераспространенными реактивами (например, биотином и стрептавидином). Хотя праймеры с биотином позволяют немедленно использовать продукт в твердофазном секвенировании.

Следует помнить, что из-за вероятностной природы методов «прогулки по геному» исследователю почти наверняка понадобится адаптировать выбранный протокол к своему объекту. Самыми значимыми факторами здесь являются качество и концентрация матричной ДНК, а в случае ПЦР со случайными праймерами — температура отжига на стадии цикла с низкой жесткостью.

Несмотря на то что сейчас все больше эти методы заменяются полногеномным секвенированием, многие из них остаются актуальными в силу экономической целесообразности проведения эксперимента.

Таблица. Обзор методов, позволяющих амплифицировать неизвестную последовательность ДНК, фланкирующую известную
Table. Review of methods enabling amplification of an unknown DNA sequence flanking a known one

Название метода	Год	Содержание метода	Нацеливание	Исключение неспецифических фрагментов	Трудоёмкость											
					рестрикция	лигирование особой последовательности	лигирование в клонирующий вектор	особая структура праймера	биотинная или изотопная метка	этап промывки или очистки	этап «закольцовывания»	особые реактивы	трудоемкая процедура ПЦР или секвенирования			
Инвертированная ПЦР [5]	1988	Рестрикция и закольцовывание фрагментов	Амплификация нужного участка с применением разнонаправленных праймеров, комплементарных концам известной последовательности	Высокоспецифичен сам по себе	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
«Vectorette» ПЦР / «пузырьковая» ПЦР [8]	1990	Рестрикция и лигирование линкера	Применение праймеров, комплементарных участкам известной последовательности ДНК и кассете	Специфическая структура линкера (пузырек) и праймера к нему	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
«Splinkerette» ПЦР [9]	1995	Рестрикция и лигирование линкера	Применение праймеров, комплементарных участкам известной последовательности ДНК и кассете	Специфическая структура линкера (шпилька) и праймера к нему	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Capture PCR [10]	1991	Рестрикция и лигирование линкера, использование праймеров, меченных биотином	Применение праймера, комплементарного участку известной последовательности ДНК и кассете	Применение биотинилированного праймера	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
EPTS/LM-PCR [12]	2001	Рестрикция и амплификация с обратными биотинилированными праймерами, лигирование олигонуклеотидной кассеты, проведение вложенной твердофазной ПЦР	Амплификация протекторов рестрикции с обратными биотинилированными праймерами	Двухэтапная вложенная ПЦР с внешним и внутренним кассетным праймером	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-

Продолжение таблицы / Table (continued)

Название метода	Год	Содержание метода	Назначение	Исключение неспецифических фрагментов	Трудоёмкость									
					рестрикция	лигирование особой последовательности	лигирование в клонирующий вектор	особая структура праймера	биотинная метка	этап промывки или очистки	этап «закольцовывания»	особые реактивы	Трудовая ПЦР или секвенирование	
«Panhandle» PCR [13]	1992	Рестрикция и лигирование одноцепочечного фосфорилированного олигонуклеотида, создание кольцевой структуры	Применение праймера, комплементарного участку известной последовательности	Дефосфорилирование фрагментов рестрикции щелочной фосфатазой	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-
«Boomerang» PCR [14]	1995	Рестрикция и лигирование адаптеров, закольцовывающих две комплементарные цепи ДНК	Применение праймера, комплементарного участку известной последовательности	После того, как была создана новая цепь вокруг последовательности адаптера, идет удлинение этой цепи по комплементарной матрице и вновь синтезируется сайт связывания праймера	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
T-linker PCR [15]	2003	ПЦР с лигированием T-линкера для прогудки по хромосомам или генам	Применение праймеров, комплементарных участкам известной последовательности ДНК и T-линкеру	Двухэтапная вложенная ПЦР	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-
ПЦР с лигированием адаптера [16]	2007	Рестрикция и лигирование двухцепочечного адаптера с длинным и коротким плечом	Применение праймера к известной последовательности и праймера, соответствующего последовательности длинного плеча адаптера	Блокирование 3'-конца короткого плеча аминокислотной группой	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-

Продолжение таблицы / Table (continued)

Название метода	Год	Содержание метода	Нацеливание	Исключение неспецифических фрагментов	Трудоёмкость												
					рестрикция	лигирование особей последовательности	лигирование вектор в клонирующий вектор	особая структура праймера	биотинная или изотопная метка	этап промывки или очистки	этап «закопцовывания»	особые реактивы	трудоемкая процедура ПЦР или секвенирования				
RSE-PCR [17]	2010	Рестрикция и изменение адаптерного праймера, позволяющего удлинить сайт рестрикции	Применение праймеров, комплементарных участку известной последовательности и удлененному сайту рестрикции	Двухэтапная вложенная ПЦР	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Template-blocking PCR [18]	2010	Рестрикция и лигирование кассеты	Применение праймеров, комплементарных участкам известной последовательности ДНК и кассете	Блокировка 3'-концов фрагментов геномной ДНК, расщепленных рестриционными ферментами, дидезоксиуклеозид-трифосфатом	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SSP-PCR [19]	1989	Рестрикция и лигирование продуктов рестрикции в вектор с последующей амплификацией	Применение праймеров, комплементарных участку известной последовательности и участку вектора	Использование генспецифического праймера	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ПЦР с целевой проглой по геному [20]	1991	Использование трех видов праймеров для проведения ПЦР: «целевого», внутреннего, меченого ³² P и «прогулочного». Повторная амплификация «меченого» фрагмента.	Использование «целевого» праймера, который гибридизуется с конкретной известной последовательностью-мишенью	Вложенная ПЦР с использованием внутренних ³² P-меченых праймеров	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Продолжение таблицы / Table (continued)

Название метода	Год	Содержание метода	Нацеливание	Исключение неспецифических фрагментов	Трудоемкость									
					рестрикция	литирование особей последовательности	литирование вектор в клонирующий вектор	особая структура праймера	биотопная метка	этап промывки или очистки	этап «закопцовывания»	особые реактивы	трудоемкая процедура ПЦР или секвенирования	
TAIL-PCR [23]	1995	Использование набора вложенных специфических к известной последовательности праймеров наряду с короткими произвольными выродженными праймерами с низкой температурой плавления и различной степенью выродженности	Применение праймеров, комплементарных участкам известной ДНК и выродженных праймеров	Чередование температур отжига позволяет контролировать относительную эффективность амплификации специфических и неспецифических продуктов	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
FPNI-PCR [25]	2011	ПЦР с фьюжн-праймерами, один участок которых представляет собой выродженную последовательность, а другой — соответствует определенной последовательности генома	Применение праймеров, комплементарных участкам известной ДНК и фьюжн-праймеров	Вложенная ПЦР	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
POP-PCR [26]	2015	ПЦР с частично перекрывающимися на 3'-конце праймерами	Применение праймеров, комплементарных участкам известной ДНК и частично перекрывающихся праймеров	Трехэтапная вложенная ПЦР	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Вклад авторов. Все авторы внесли вклад в разработку концепции статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией. Вклад каждого автора: Л.А. Лутова — постановка задачи, формирование выводов; Е.С. Окулова — анализ литературы, написание основного текста, табличное и графическое представление результатов; М.С. Бураковский — помощь в описании методов.

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

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

Дополнительные материалы.

Приложение 1. Схематическое изображение принципа EPTS/LM-PCR. doi: 10.17816/ecogen624820-4200622

Приложение 2. Схематическое изображение принципа «Panhandle»-PCR. doi: 10.17816/ecogen624820-4200624

Приложение 3. Схематическое изображение принципа «boomerang»-PCR. doi: 10.17816/ecogen624820-4200626

Приложение 4. Схематическое изображение принципа ПЦР с лигированием адаптера. doi: 10.17816/ecogen624820-4200627

Приложение 5. Схематическое изображение принципа ПЦР с удлинением сайта рестрикции. doi: 10.17816/ecogen624820-4200628

Приложение 6. Схематическое изображение принципа ПЦР с блокированием матрицы. doi: 10.17816/ecogen624820-4200629

Приложение 7. Схематическое изображение принципа SSP-PCR. doi: 10.17816/ecogen624820-4200630

Приложение 8. Схематическое изображение принципа ПЦР сайта рестрикции. doi: 10.17816/ecogen624820-4200631

Приложение 9. Схематическое изображение принципа метода FPNI-PCR. doi: 10.17816/ecogen624820-4200637

Приложение 10. Схематическое изображение принципа метода SWPOP-PCR. doi: 10.17816/ecogen624820-4200638

Приложение 11. Схематическое изображение принципа метода PST-PCR. doi: 10.17816/ecogen624820-4200639

Приложение 12. Схематическое изображение принципа метода SLRA-PCR. doi: 10.17816/ecogen624820-4200640

Приложение 13. Схематическое изображение принципа метода FPR-PCR. doi: 10.17816/ecogen624820-4200641

Приложение 14. Схематическое изображение принципа метода wristwatch PCR. doi: 10.17816/ecogen624820-4200644

Приложение 15. Схематическое изображение принципа независимого от рестрикции метода клонирования сегментов геномной ДНК за пределами известных последовательностей. doi: 10.17816/ecogen624820-4200645

ADDITIONAL INFORMATION

Authors' contribution. All authors contributed to the development of the article's concept, read, and approved the final version before publication. Personal contribution of the authors: L.A. Lutova — problem statement, drawing conclusions; E.S. Okulova — literature analysis, writing the main text, tabular and graphical presentation of results; M.S. Burlakovskiy — assistance in describing methods.

Funding source. This study was not supported by any external sources of funding.

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

Additional materials.

Supplement 1. Schematic representation of the EPTS/LM-PCR method principle. doi: 10.17816/ecogen624820-4200622

Supplement 2. Schematic representation of the “Panhandle”-PCR method principle. doi: 10.17816/ecogen624820-4200624

Supplement 3. Schematic representation of the “boomerang”-PCR method principle. doi: 10.17816/ecogen624820-4200626

Supplement 4. Schematic representation of the PCR principle with adapter ligation. doi: 10.17816/ecogen624820-4200627

Supplement 5. Schematic representation of the PCR principle with restriction site elongation. doi: 10.17816/ecogen624820-4200628

Supplement 6. Schematic representation of the Template-blocking PCR principle. doi: 10.17816/ecogen624820-4200629

Supplement 7. Schematic representation of the SSP-PCR principle. doi: 10.17816/ecogen624820-4200630

Supplement 8. Schematic representation of the PCR principle with a restriction site. doi: 10.17816/ecogen624820-4200631

Supplement 9. Schematic representation of the FPNI-PCR method principle. doi: 10.17816/ecogen624820-4200637

Supplement 10. Schematic representation of the SWPOP-PCR method principle. doi: 10.17816/ecogen624820-4200638

Supplement 11. Schematic representation of the PST-PCR method principle. doi: 10.17816/ecogen624820-4200639

Supplement 12. Schematic representation of the SLRA-PCR method principle. doi: 10.17816/ecogen624820-4200640

Supplement 13. Schematic representation of the FPR-PCR method principle. doi: 10.17816/ecogen624820-4200641

Supplement 14. Schematic representation of the wristwatch PCR method principle. doi: 10.17816/ecogen624820-4200644

Supplement 15. Schematic representation of the restriction-independent method for cloning genomic DNA segments beyond known sequences. doi: 10.17816/ecogen624820-4200645

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pei J., Sun T., Wang L., et al. Fusion primer driven racket PCR: A novel tool for genome walking // *Front Genet.* 2022. Vol. 13. ID 969840. doi: 10.3389/fgene.2022.969840
2. Uchiyama T., Watanabe K. Improved inverse PCR scheme for metagenome walking // *Biotechniques.* 2006. Vol. 41, N. 2. P. 183–188. doi: 10.2144/000112210

3. Kotik M. Novel genes retrieved from environmental DNA by polymerase chain reaction: Current genome-walking techniques for future metagenome applications // *J Biotechnol.* 2009. Vol. 144, N. 2. P. 75–82. doi: 10.1016/j.jbiotec.2009.08.013
4. Chang K., Wang Q., Shi X., et al. Stepwise partially overlapping primer-based PCR for genome walking // *AMB Express.* 2018. Vol. 8, N. 1. ID 77. doi: 10.1186/s13568-018-0610-7
5. Ochman H., Gerber A.S., Hartl D.L. Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction // *Genetics.* 1988. Vol. 120, N. 3. P. 621–623. doi: 10.1093/genetics/120.3.621
6. Hui E.K.-W., Wang P.-C., Lo S.J. Strategies for cloning unknown cellular flanking DNA sequences from foreign integrants // *Cell Mol Life Sci.* 1998. Vol. 54, N. 12. P. 1403–1411. doi: 10.1007/s000180050262
7. Kalendar R., Shustov A.V., Schulman A.H. Palindromic sequence-targeted (PST) PCR, version 2: An advanced method for high-throughput targeted gene characterization and transposon display // *Front Plant Sci.* 2021. Vol. 12. ID 691940. doi: 10.3389/fpls.2021.691940
8. Riley J., Butler R., Ogilvie D., et al. A novel, rapid method for the isolation of terminal sequences from yeast artificial chromosome (YAC) clones // *Nucleic Acids Res.* 1990. Vol. 18, N. 10. P. 2887–2890. doi: 10.1093/nar/18.10.2887
9. Devon R.S., Porteous D.J., Brookes A.J. Splinkerettes — improved vectorettes for greater efficiency in PCR walking // *Nucleic Acids Res.* 1995. Vol. 23, N. 9. P. 1644–1645. doi: 10.1093/nar/23.9.1644
10. Lagerstrom M., Parik J., Malmgren H., et al. Capture PCR: efficient amplification of DNA fragments adjacent to a known sequence in human and YAC DNA // *Genome Res.* 1991. Vol. 1, N. 2. P. 111–119. doi: 10.1101/gr.1.2.111
11. Sarkar G., Turner R.T., Bolander M.E. Restriction-site PCR: a direct method of unknown sequence retrieval adjacent to a known locus by using universal primers // *Genome Res.* 1993. Vol. 2, N. 4. P. 318–322. doi: 10.1101/gr.2.4.318
12. Schmidt M., Hoffmann G., Wissler M., et al. Detection and direct genomic sequencing of multiple rare unknown flanking DNA in highly complex samples // *Hum Gene Ther.* 2001. Vol. 12, N. 7. P. 743–749. doi: 10.1089/104303401750148649
13. Jones D.H., Winistorfer S.C. Sequence specific generation of a DNA panhandle permits PCR amplification of unknown flanking DNA // *Nucleic Acids Res.* 1992. Vol. 20, N. 3. P. 595–600. doi: 10.1093/nar/20.3.595
14. Hengen P.N. Vectorette, splinkerette and boomerang DNA amplification // *Trends Biochem Sci.* 1995. Vol. 20, N. 9. P. 372–373. doi: 10.1016/s0968-0004(00)89079-9
15. Yuanxin Y., Chengcai A., Li L., et al. T-linker-specific ligation PCR (T-linker PCR): an advanced PCR technique for chromosome walking or for isolation of tagged DNA ends // *Nucleic Acids Res.* 2003. Vol. 31, N. 12. P. e68. doi: 10.1093/nar/gng068
16. O'Malley R.C., Alonso J.M., Kim C.J., et al. An adapter ligation-mediated PCR method for high-throughput mapping of T-DNA inserts in the *Arabidopsis* genome // *Nat Protoc.* 2007. Vol. 2. P. 2910–2917. doi: 10.1038/nprot.2007.425
17. Ji J., Braam J. Restriction site extension PCR: A novel method for high-throughput characterization of tagged DNA fragments and genome walking // *PLoS ONE.* 2010. Vol. 5, N. 5. ID 10577. doi: 10.1371/journal.pone.0010577
18. Bae J.-H., Sohn J.-H. Template-blocking PCR: An advanced PCR technique for genome walking // *Anal Biochem.* 2010. Vol. 398, N. 1. P. 112–116. doi: 10.1016/j.ab.2009.11.003
19. Shyamala V., Ames G.F. Genome walking by single-specific-primer polymerase chain reaction: SSP-PCR // *Gene.* 1989. Vol. 84, N. 1. P. 1–8. doi: 10.1016/0378-1119(89)90132-7
20. Parker J.D., Rabinovitch P.S., Burner G.C. Targeted gene walking polymerase chain reaction // *Nucleic Acids Res.* 1991. Vol. 19, N. 11. P. 3055–3060. doi: 10.1093/nar/19.11.3055
21. Myrick K.V., Gelbart W.M. Universal fast walking for direct and versatile determination of flanking sequence // *Gene.* 2002. Vol. 284, N. 1–2. P. 125–131. doi: 10.1016/s0378-1119(02)00384-0
22. Tan G., Gao Y., Shi M., et al. SiteFinding-PCR: a simple and efficient PCR method for chromosome walking // *Nucleic Acids Res.* 2005. Vol. 33, N. 13. P. e122. doi: 10.1093/nar/gni124
23. Liu Y.-G., Whittier R.F. Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking // *Genomics.* 1995. Vol. 25, N. 3. P. 674–681. doi: 10.1016/0888-7543(95)80010-j
24. Zeng T., Zhang D., Li Y., et al. Identification of genomic insertion and flanking sequences of the transgenic drought-tolerant maize line “SbSNAC1-382” using the single-molecule real-time (SMRT) sequencing method // *PLoS One.* 2020. Vol. 15, N. 4. ID e0226455. doi: 10.1371/journal.pone.0226455
25. Wang Z., Ye S., Li J., et al. Fusion primer and nested integrated PCR (FPNI-PCR): a new high-efficiency strategy for rapid chromosome walking or flanking sequence cloning // *BMC Biotechnol.* 2011. Vol. 11. ID 109. doi: 10.1186/1472-6750-11-109
26. Li H., Ding D., Cao Y., et al. Partially overlapping primer-based PCR for genome walking // *PLoS One.* 2015. Vol. 10, N. 3. ID 120139. doi: 10.1371/journal.pone.0120139
27. Rose T.M., Schultz E.R., Henikoff J.G., et al. Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences // *Nucleic Acids Res.* 1998. Vol. 26, N. 7. P. 1628–1635. doi: 10.1093/nar/26.7.1628
28. Levano-Garcia J., Verjovski-Almeida S., da Silva A.C. Mapping transposon insertion sites by touchdown PCR and hybrid degenerate primers // *Biotechniques.* 2005. Vol. 38, N. 2. P. 225–229. doi: 10.2144/05382ST03
29. Li F., Fu C., Li Q. A simple genome walking strategy to isolate unknown genomic regions using long primer and RAPD primer // *Iran J Biotechnol.* 2019. Vol. 17, N. 2. ID e2183. doi: 10.21859/ijb.2183
30. Wang L., Jia M., Li Z., et al. Wristwatch PCR: A versatile and efficient genome walking strategy // *Front Bioeng Biotechnol.* 2022. Vol. 10. ID 792848. doi: 10.3389/fbioe.2022.792848
31. Frohman M.A., Dush M.K., Martin G.R. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer // *PNAS USA.* 1988. Vol. 85, N. 23. P. 8998–9002. doi: 10.1073/pnas.85.23.8998
32. Zhou M.Y., Gomez-Sanchez C.E. Universal TA cloning // *Curr Issues Mol Biol.* 2000. Vol. 2, N. 1. P. 1–7.
33. Rudi K., Fossheim T., Jakobsen K.S. Restriction cutting independent method for cloning genomic DNA segments outside the boundaries of known sequences // *Biotechniques.* 1999. Vol. 27, N. 6. P. 1170–1172. doi: 10.2144/99276st03

34. Spalinskas R., Van den Bulcke M., Van den Eede G., Milcamps A. LT-RADE: An efficient user-friendly genome walking method applied to the molecular characterization of the insertion site of genetically modified maize MON810 and rice LLRICE62 // *Food Anal Methods*. 2013. Vol. 6. P. 705–713. doi: 10.1007/s12161-012-9438-y

35. Leoni C., Gallerani R., Ceci L.R. A genome walking strategy for the identification of eukaryotic nucleotide sequences adjacent to known regions // *BioTechniques*. 2008. Vol. 44, N. 2. P. 229–235. doi: 10.2144/000112680

REFERENCES

1. Pei J, Sun T, Wang L, et al. Fusion primer driven racket PCR: A novel tool for genome walking. *Front Genet*. 2022;13:969840. doi: 10.3389/fgene.2022.969840

2. Uchiyama T, Watanabe K. Improved inverse PCR scheme for metagenome walking. *Biotechniques*. 2006;41(2):183–188. doi: 10.2144/000112210

3. Kotik M. Novel genes retrieved from environmental DNA by polymerase chain reaction: Current genome-walking techniques for future metagenome applications. *J Biotechnol*. 2009;144(2):75–82. doi: 10.1016/j.jbiotec.2009.08.013

4. Chang K, Wang Q, Shi X, et al. Stepwise partially overlapping primer-based PCR for genome walking. *AMB Express*. 2018;8(1):77. doi: 10.1186/s13568-018-0610-7

5. Ochman H, Gerber AS, Hartl DL. Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics*. 1988;120(3):621–623. doi: 10.1093/genetics/120.3.621

6. Hui EK-W, Wang P-C, Lo SJ. Strategies for cloning unknown cellular flanking DNA sequences from foreign integrants. *Cell Mol Life Sci*. 1998;54(12):1403–1411. doi: 10.1007/s000180050262

7. Kalendar R, Shustov AV, Schulman AH. Palindromic sequence-targeted (PST) PCR, version 2: An advanced method for high-throughput targeted gene characterization and transposon display. *Front Plant Sci*. 2021;12:691940. doi: 10.3389/fpls.2021.691940

8. Riley J, Butler R, Ogilvie D, et al. A novel, rapid method for the isolation of terminal sequences from yeast artificial chromosome (YAC) clones. *Nucleic Acids Res*. 1990;18(10):2887–2890. doi: 10.1093/nar/18.10.2887

9. Devon RS, Porteous DJ, Brookes AJ. Splinkerettes — improved vectorettes for greater efficiency in PCR walking. *Nucleic Acids Res*. 1995;23(9):1644–1645. doi: 10.1093/nar/23.9.1644

10. Lagerstrom M, Parik J, Malmgren H, et al. Capture PCR: efficient amplification of DNA fragments adjacent to a known sequence in human and YAC DNA. *Genome Res*. 1991;1(2):111–119. doi: 10.1101/gr.1.2.111

11. Sarkar G, Turner RT, Bolander ME. Restriction-site PCR: a direct method of unknown sequence retrieval adjacent to a known locus by using universal primers. *Genome Res*. 1993;2(4):318–322. doi: 10.1101/gr.2.4.318

12. Schmidt M, Hoffmann G, Wissler M, et al. Detection and direct genomic sequencing of multiple rare unknown flanking DNA in highly complex samples. *Hum Gene Ther*. 2001;12(7):743–749. doi: 10.1089/104303401750148649

13. Jones DH, Winistorfer SC. Sequence specific generation of a DNA panhandle permits PCR amplification of unknown flanking DNA. *Nucleic Acids Res*. 1992;20(3):595–600. doi: 10.1093/nar/20.3.595

36. Tsaftaris A., Pasentzis K., Argiriou A. Rolling circle amplification of genomic templates for inverse PCR (RCA–GIP): a method for 5'- and 3'-genome walking without anchoring // *Biotechnol Lett*. 2010. Vol. 32. P. 157–161. doi: 10.1007/s10529-009-0128-9

37. Dekker J., Rippe K., Dekker M., Kleckner N. Capturing chromosome conformation // *Science*. 2002. Vol. 295, N. 5558. P. 1306–1311. doi: 10.1126/science.1067799

38. Krispil R., Tannenbaum M., Sarusi-Portuguez A., et al. The position and complex genomic architecture of plant T-DNA insertions revealed by 4SEE // *Int J Mol Sci*. 2020. Vol. 21. ID 2373. doi: 10.3390/ijms21072373

14. Hengen PN. Vectorette, splinkerette and boomerang DNA amplification. *Trends Biochem Sci*. 1995;20(9):372–373. doi: 10.1016/s0968-0004(00)89079-9

15. Yuanxin Y, Chengcai A, Li L, et al. T-linker-specific ligation PCR (T-linker PCR): an advanced PCR technique for chromosome walking or for isolation of tagged DNA ends. *Nucleic Acids Res*. 2003;31(12):e68. doi: 10.1093/nar/gng068

16. O'Malley RC, Alonso JM, Kim CJ, et al. An adapter ligation-mediated PCR method for high-throughput mapping of T-DNA inserts in the *Arabidopsis* genome. *Nat Protoc*. 2007;2:2910–2917. doi: 10.1038/nprot.2007.425

17. Ji J, Braam J. Restriction site extension PCR: A novel method for high-throughput characterization of tagged DNA fragments and genome walking. *PLoS ONE*. 2010;5(5):10577. doi: 10.1371/journal.pone.0010577

18. Bae J-H, Sohn J-H. Template-blocking PCR: An advanced PCR technique for genome walking. *Anal Biochem*. 2010;398(1):112–116. doi: 10.1016/j.ab.2009.11.003

19. Shyamala V, Ames GF. Genome walking by single-specific-primer polymerase chain reaction: SSP-PCR. *Gene*. 1989;84(1):1–8. doi: 10.1016/0378-1119(89)90132-7

20. Parker JD, Rabinovitch PS, Burmer GC. Targeted gene walking polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res*. 1991;19(11):3055–3060. doi: 10.1093/nar/19.11.3055

21. Myrick KV, Gelbart WM. Universal fast walking for direct and versatile determination of flanking sequence. *Gene*. 2002;284(1–2):125–131. doi: 10.1016/s0378-1119(02)00384-0

22. Tan G, Gao Y, Shi M, et al. SiteFinding-PCR: a simple and efficient PCR method for chromosome walking. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(13):e122. doi: 10.1093/nar/gni124

23. Liu Y-G, Whittier RF. Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking. *Genomics*. 1995;25(3):674–681. doi: 10.1016/0888-7543(95)80010-j

24. Zeng T, Zhang D, Li Y, et al. Identification of genomic insertion and flanking sequences of the transgenic drought-tolerant maize line “SbSNAC1-382” using the single-molecule real-time (SMRT) sequencing method. *PLoS One*. 2020;15(4):e0226455. doi: 10.1371/journal.pone.0226455

25. Wang Z, Ye S, Li J, et al. Fusion primer and nested integrated PCR (FPNI-PCR): a new high-efficiency strategy for rapid chromosome walking or flanking sequence cloning. *BMC Biotechnol*. 2011;11:109. doi: 10.1186/1472-6750-11-109

26. Li H, Ding D, Cao Y, et al. Partially overlapping primer-based PCR for genome walking. *PLoS One*. 2015;10(3):120139. doi: 10.1371/journal.pone.0120139

27. Rose TM, Schultz ER, Henikoff JG, et al. Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences. *Nucleic Acids Res.* 1998;26(7):1628–1635. doi: 10.1093/nar/26.7.1628
28. Levano-Garcia J, Verjovski-Almeida S, da Silva AC. Mapping transposon insertion sites by touchdown PCR and hybrid degenerate primers. *Biotechniques.* 2005;38(2):225–229. doi: 10.2144/05382ST03
29. Li F, Fu C, Li Q. A simple genome walking strategy to isolate unknown genomic regions using long primer and RAPD primer. *Iran J Biotechnol.* 2019;17(2): e2183. doi: 10.21859/ijb.2183
30. Wang L, Jia M, Li Z, et al. Wristwatch PCR: A versatile and efficient genome walking strategy. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022;10:792848. doi: 10.3389/fbioe.2022.792848
31. Frohman MA, Dush MK, Martin GR. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *PNAS USA.* 1988;85(23): 8998–9002. doi: 10.1073/pnas.85.23.8998
32. Zhou MY, Gomez-Sanchez CE. Universal TA cloning. *Curr Issues Mol Biol.* 2000;2(1):1–7.
33. Rudi K, Fosshem T, Jakobsen KS. Restriction cutting independent method for cloning genomic DNA segments outside the boundaries of known sequences. *Biotechniques.* 1999;27(6):1170–1172. doi: 10.2144/99276st03
34. Spalinskas R, Van den Bulcke M, Van den Eede G, Milcamps A. LT-RADE: An efficient user-friendly genome walking method applied to the molecular characterization of the insertion site of genetically modified maize MON810 and rice LLRICE62. *Food Anal Methods.* 2013;6:705–713. doi: 10.1007/s12161-012-9438-y
35. Leoni C, Gallerani R, Ceci LR. A genome walking strategy for the identification of eukaryotic nucleotide sequences adjacent to known regions. *BioTechniques.* 2008;44(2):229–235. doi: 10.2144/000112680
36. Tsafaris A, Pasentzis K, Argiriou A. Rolling circle amplification of genomic templates for inverse PCR (RCA-GIP): a method for 5'- and 3'-genome walking without anchoring. *Biotechnol Lett.* 2010;32: 157–161. doi: 10.1007/s10529-009-0128-9
37. Dekker J, Rippe K, Dekker M, Kleckner N. Capturing chromosome conformation. *Science.* 2002;295(5558):1306–1311. doi: 10.1126/science.1067799
38. Krispil R, Tannenbaum M, Sarusi-Portuguez A, et al. The position and complex genomic architecture of plant T-DNA insertions revealed by 4SEE. *Int J Mol Sci.* 2020;21:2373. doi: 10.3390/ijms21072373

ОБ АВТОРАХ

***Елена Сергеевна Окулова;** адрес: Россия, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7–9; ORCID: 0009-0001-7349-8925; eLibrary SPIN: 7166-0090; e-mail: elenaok.advert@gmail.com

Михаил Сергеевич Бурлаковский, канд. биол. наук; ORCID: 0000-0001-6694-0423; eLibrary SPIN: 3679-0860; e-mail: burmish@yandex.ru

Людмила Алексеевна Лутова, д-р биол. наук, профессор; ORCID: 0000-0001-6125-0757; Scopus Author ID: 6603722721; eLibrary SPIN: 3685-7136; e-mail: la.lutova@gmail.com

AUTHORS' INFO

***Elena S. Okulova;** address: 7–9 Universitetskaya emb., Saint Petersburg, 199034, Russia; ORCID: 0009-0001-7349-8925; eLibrary SPIN: 7166-0090; e-mail: elenaok.advert@gmail.com

Mikhail S. Burlakovsky, Cand. Sci. (Biology); ORCID: 0000-0001-6694-0423; eLibrary SPIN: 3679-0860; e-mail: burmish@yandex.ru

Ludmila A. Lutova, Dr. Sci. (Biology), Professor; ORCID: 0000-0001-6125-0757; Scopus Author ID: 6603722721; eLibrary SPIN: 3685-7136; e-mail: la.lutova@gmail.com

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author