

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ И ГЕНЕТИКИ  
УФИМСКОГО ФЕДЕРАЛЬНОГО ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ЦЕНТРА  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

*На правах рукописи*

**Ахметзянова Лиана Ульфатовна**

**МОДЕЛИРОВАНИЕ РЕАКЦИИ ПЕТЛЕВОЙ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ  
АМПЛИФИКАЦИИ И СОЗДАНИЕ КОМПЬЮТЕРНЫХ ПРОГРАММ  
ДИЗАЙНА ПРАЙМЕРНЫХ СИСТЕМ**

Специальность 1.5.3. Молекулярная биология (биологические науки)

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель  
доктор биологических наук, профессор  
А.В. Чемерис

Уфа – 2025

## ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1. Общие представления об амплификации нуклеиновых кислот.....	12
1.2. Петлевая изотермическая амплификация.....	15
1.2.1. Дизайн праймеров в LAMP.....	18
1.2.2. Структура продуктов LAMP.....	22
1.2.3. Применение LAMP.....	25
1.3. Подбор LAMP-праймеров.....	28
1.3.1. Программы подбора LAMP-праймеров.....	30
1.3.2. Алгоритмы поиска праймеров.....	39
ГЛАВА II. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	46
2.1. Реактивы и материалы, использованные в работе.....	46
2.2. Олигонуклеотиды, использованные в работе.....	46
2.3. Моделирование LAMP-реакции и программы подбора LAMP- праймеров.....	49
2.4. Молекулярно-биологические методы исследований.....	50
2.4.1. Объекты исследования.....	50
2.4.2. Лигирование НР-проб.....	50
2.4.3. Петлевая изотермическая амплификация.....	51
2.4.4. Гель-электрофорез.....	51
2.4.5. Нанопоровое секвенирование лампликонов.....	52
ГЛАВА III. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	53
3.1. Новая номенклатура продуктов LAMP.....	55
3.1.1. Этапы преамплификационной фазы классической LAMP-реакции....	55
3.1.2. Типы продуктов в LAMP-реакции.....	58
3.2. Номенклатура продуктов LAMP с дополнительными праймерами.....	69
3.3. Альтернативные варианты LAMP-реакции.....	80

3.4. Алгоритмы дизайна LAMP-праймеров.....	82
3.4.1. Дизайн LAMP-праймеров на основе существующих алгоритмов.....	82
3.4.2. Дизайн LAMP-праймеров на основе собственного алгоритма .....	85
3.5. Компьютерные программы дизайна LAMP-праймеров.....	91
3.5.1. LAMPprimers iQ и LAMPprimers iQ_loop.....	91
3.5.2. Программы подбора праймеров для технологий MIP-LAMP, mirLAMP и LigLAMP. ....	98
3.6. Обнаружение специфических мишеней с помощью различных вариантов LAMP .....	100
3.6.1. Экспериментальная оценка эффективности работы LAMPprimers iQ...100	
3.6.2. Экспериментальная оценка эффективности работы MIP-LAMP.....	106
3.6.3. Экспериментальная оценка эффективности работы LigLAMP и mirLAMP .....	106
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	109
ВЫВОДЫ.....	111
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	112
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Свидетельства о регистрации программ для ЭВМ.....	139

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

COVID-19 – заболевание, вызываемое коронавирусом SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 – Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, коронавирус, вызывающий тяжелый острый респираторный синдром

LAMP – loop-mediated isothermal amplification, петлевая изотермическая амплификация

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

РНК – рибонуклеиновая кислота

Ct – threshold cycle, пороговый цикл

Tt – threshold time, пороговое время

НК – нуклеиновые кислоты

п.н. – пара нуклеотидов

MIP-LAMP – “Псевдо-полувложенная» LAMP”

LigLAMP – детекция микроРНК с использованием лигазы применяя LAMP

mirLAMP – детекция микроРНК с помощью LAMP

## ВВЕДЕНИЕ

### *Актуальность темы*

В настоящее время все более широкое применение находит анализ биологических образцов путем обнаружения в них специфических последовательностей нуклеиновых кислот (НК) с помощью амплификации – ферментативной реакции, приводящей к наработке фрагментов ДНК в количестве, которое может быть детектировано инструментальными методами. Разработано множество методов амплификации НК, различающихся вариантами проведения реакции и способами детекции ее результатов. Самым популярным методом остается полимеразная цепная реакция – ПЦР (Saiki et al., 1985), которая включает несколько этапов, протекающих при разных температурах. Однако из-за необходимости термоциклирования продолжительность ПЦР составляет около 1,5 ч, в связи с этим растет интерес к более быстрым реакциям амплификации, протекающим при постоянной температуре (Бодулев, Сахаров, 2020). Среди таковых наиболее популярной стала петлевая изотермическая амплификация – LAMP (Notomi et al., 2000). LAMP наиболее широко применяется для быстрой детекции генетического материала бактериальных и вирусных патогенов (Sadeghi et al., 2021; Soroka et al., 2021; Park, 2022; Garg et al., 2022). Активное развитие метод LAMP получил с началом пандемии COVID-19 для обнаружения SARS-CoV-2 (Moore et al., 2021; Li et al., 2022).

В отличие от классической ПЦР, для проведения которой необходимы два праймера (прямой и обратный), для протекания реакции LAMP требуется более сложная система праймеров. В первоначально предложенном варианте LAMP использовались два внешних – F3 и B3, и два внутренних – FIP и BIP праймера. F3 и B3 необходимы для образования одноцепочечной ДНК и требуются только на начальном этапе. Мотивы F1c и B1c в составе FIP и BIP отжигаются позже на синтезирующихся цепях ДНК. За счет них формируются гантелеподобные (dumbbell) структуры, запускающие

наработку продуктов разной длины – лампиконов. Для ускорения наработки лампиконов было добавлено еще два праймера, отжигающихся на участках между последовательностями F1c и F2, а также между B1c и B2, получившие название петлевых (FLP и BLP, или LoopF и LoopB). Были сделаны и другие попытки добиться ускорения протекания LAMP за счет использования стержневых праймеров (Gandelman et al., 2011) или дополнительных внутренних праймеров (Wang et al., 2015), но они характеризуются своими недостатками и требуются иные подходы для достижения этой цели (Nagamine et al., 2002).

Дизайн LAMP-праймеров представляет собой трудную задачу, при этом количество соответствующих компьютерных программ их подбора не превышает десяти. Существующие программы имеют определенные ограничения: позволяют осуществлять подбор на основе ограниченных по длине нуклеотидных последовательностей, не учитывают возможность образования гомо- и гетеродимеров праймеров, не позволяют подбирать мультиплексные праймерные системы. Это приводит к подбору праймеров недостаточно высокого качества, что часто обуславливает получение недостоверных результатов LAMP-анализа (Зырина, Антипова, 2021; Meagher et al., 2018; Rolando et al., 2020). Таким образом, создание инструмента для дизайна «качественных» праймеров для петлевой изотермической амплификации является актуальной задачей.

### ***Цель и основные задачи исследования***

Целью исследования стало выяснение характера протекания петлевой изотермической амплификации (LAMP), разработка различных вариантов этой реакции и создание компьютерных программ для дизайна соответствующих LAMP-праймерных систем.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Оптимизировать номенклатуру зон в мишени/лампликонах в LAMP-реакции, смоделировать ее протекание и определить структуру продуктов LAMP;
2. Разработать новые варианты реакции LAMP и смоделировать соответствующие молекулярные системы, пригодные для обнаружения специфических НК-мишеней;
3. Определить оптимальные критерии и алгоритм подбора специфичных LAMP-праймеров;
4. Разработать компьютерные программы дизайна LAMP-праймеров для разных вариантов реакции, провести *in silico* тестирование их функционала;
5. Показать принципиальную возможность обнаружения специфических НК-мишеней с помощью праймеров, сконструированных разработанными компьютерными программами.

### ***Научная новизна исследования***

Предложена новая система обозначений (номенклатура) зон отжига LAMP-праймеров, облегчающая понимание структуры праймеров и продуктов реакции, а также подбор нетипичных праймерных систем. Разработан новый алгоритм подбора LAMP-праймеров, включающий новую математическую модель расчета температуры отжига праймеров и подразумевающий задание более жестких критериев их отбора и возможность сближения зон отжига. Разработаны новые варианты LAMP, предназначенные для обнаружения специфических НК-мишеней. Написано пять компьютерных программ для дизайна специфичных LAMP-праймеров: LAMPprimers iQ (Loop-mediated isothermal amplification Primers iQ), позволяет подбирать четыре стандартных праймера при жестких условиях; Дизайн праймеров для петлевой изотермической амплификации (LAMPprimers iQ\_loop), позволяет подбирать шесть праймеров, включая петлевые; Дизайн олигонуклеотидных шпилечных структур для лигирования на

поддерживающей матрице и последующей LAMP-амплификации (LigLAMP), проектирует ДНК-шпильки, лигируемые на микроРНК, и праймеры для LAMP мишени, образующейся при лигировании; «Дизайн праймеров для LAMP-амплификации микроРНК (miRLAMP)», позволяет детектировать микроРНК с помощью LAMP; Дизайн множественных внутренних праймеров для петлевой изотермической амплификации (MIP-LAMP).

### ***Теоретическая и практическая значимость работы***

Результаты работы облегчают понимание структуры LAMP-праймеров и продуктов реакции, процесс подбора праймеров, особенно для нетрадиционных вариантов реакции. Предложенные новые варианты LAMP обеспечивают расширение спектра мишеней, которые можно обнаружить данным методом. Разработанные компьютерные программы расширяют арсенал программных средств для дизайна LAMP-праймеров, обеспечивают более высокую специфичность обнаружения НК-мишеней благодаря оптимизированному алгоритму их подбора. Они могут применяться в научно-исследовательских учреждениях и лабораториях, занимающихся амплификацией нуклеиновых кислот, например, при решении ряда задач молекулярной биологии, для создания диагностических тест-систем, обеспечивающих высокую чувствительность и достоверность обнаружения специфических РНК и ДНК.

### ***Методология и методы исследования***

При выполнении работы использовались методы молекулярной биологии: выделение нуклеиновых кислот, конструирование олигонуклеотидных матриц и праймеров, амплификация нуклеиновых кислот, гель-электрофоретический анализ, секвенирование; методы молекулярного моделирования и компьютерного программирования.

### ***Положения, выносимые на защиту***

1. Новая система обозначений зон отжига LAMP-праймеров значительно облегчает понимание их структуры и обеспечивает более точный подбор праймерных систем, особенно для нетрадиционных вариантов реакции.
2. Разработанные варианты LAMP-реакции показывают возможность успешного обнаружения мРНК с помощью данного метода.
3. Новый алгоритм подбора LAMP-праймеров обеспечивает более высокую специфичность обнаружения с их помощью НК-мишеней.

### ***Соответствие диссертации паспорту научной специальности***

Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 1.5.3 – Молекулярная биология (биологические науки) и затрагивает проблемы, связанные с молекулярным моделированием НК-НК взаимодействий и разработкой новых методов исследования биополимеров и их комплексов.

### ***Апробация результатов исследования***

Результаты диссертационного исследования были представлены на следующих конференциях: Международная научная конференция «Параллельные вычислительные технологии (ПаВТ'2020)» (г. Пермь, 2020 г.), Международная научная конференция «Уфимская осенняя математическая школа» (г. Уфа, 2020 г.), XXVIII Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов», секция «Биоинженерия и биоинформатика» (г. Москва, 2020 г.), Международную конференцию «Марчуковские научные чтения» (г. Новосибирск, 2020 г.), IX Международная научная молодежная школа-семинар «Математическое моделирование, численные методы и комплексы программ имени Е.В. Воскресенского» (г. Саранск, 2020 г.), XIII Всероссийская научная интернет-конференция Интеграция науки и высшего образования в области био- и органической химии и биотехнологии (г. Уфа, 2021 г.), Международная

научно-практическая конференция «Интеллектуальные информационные технологии и математическое моделирование (ИИТ&ММ-2021)» (г. Геленджик, п. Дивноморское, 2021 г.), Международная научная конференция «Уфимская осенняя математическая школа» (г. Уфа, 2021 г.), Международная научная конференция «Параллельные вычислительные технологии (ПаВТ'2021)» (г. Волгоград, 2021 г.), The Thirteenth International Multiconference. Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology (BGRS/SB-2022) (г. Новосибирск, 2022 г.), Международная научно-практическая конференция «Интеллектуальные информационные технологии и математическое моделирование (ИИТ&ММ-2022)» (г. Геленджик, п. Дивноморское, 2022 г.). Международная научная конференция «Параллельные вычислительные технологии (ПаВТ'2021)» (г. Челябинск, 2024 г.).

### ***Объем и структура работы***

Диссертационная работа изложена на 142 страницах, состоит из введения, обзора литературы (глава I), описания материалов и методов (глава II), обсуждения результатов (глава III), выводов и списка литературы (220 наименований). Работа содержит 8 таблиц и 36 рисунков.

По материалам диссертационной работы опубликовано 17 научных трудов, из них 5 статей в журналах, индексируемых в WoS/Scopus и/или из перечня ВАК, 4 статьи в РИНЦ, 8 тезисов докладов на всероссийских и международных конференциях. Получено 4 свидетельства о регистрации программ для ЭВМ.

### ***Личный вклад автора***

Определение темы диссертационной работы, цели и задач исследования проводились автором совместно с научным руководителем. Автор оптимизировал номенклатуру и смоделировал структуру продуктов LAMP-реакции. Разработал новые варианты реакции и смоделировал

соответствующие молекулярные схемы. Автор лично разработал пять компьютерных программ для подбора LAMP-праймеров. Автором систематизированы результаты исследования, подготовлены и опубликованы печатные работы в различных журналах, которые отражают основные результаты работы.

### ***Благодарности***

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант «Аспиранты», № 20-37-90091 (2020-2022) «Разработка программы дизайна праймеров для Loop AMPlification - петлевой изотермической амплификации на основе технологий машинного обучения»).

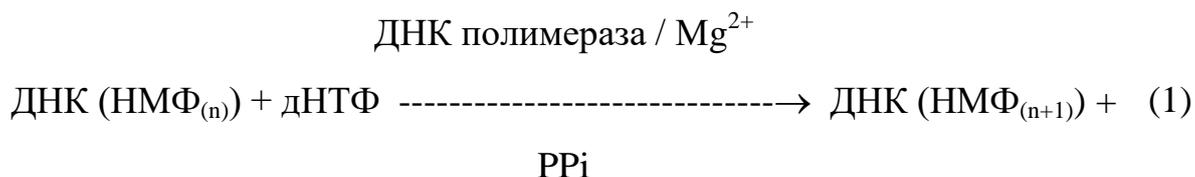
Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю, Заслуженному деятелю науки РФ, доктору биологических наук, профессору Чемерису Алексею Викторовичу за постановку цели и задач, поддержку и полезные советы на всех этапах выполнения диссертационной работы. Автор также выражает благодарность д.ф.-м.н., профессору Губайдуллину Иреку Марсовичу за наставления, ценные советы и всестороннюю поддержку, д.х.н. Гарафутдинову Равилю Ринатовичу за консультации, ценные советы и замечания и к.б.н. Сахабутдиновой Ассоль Рафиковне за помощь в освоении методов молекулярной биологии.

# ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1.1. Общие представления об амплификации нуклеиновых кислот

Амплификация нуклеиновых кислот (НК) – это метод, обеспечивающий наработку определенного фрагмента нуклеотидной последовательности в ходе ферментативной реакции. Амплификация НК является одним из наиболее важных методов в молекулярной биологии и прочих науках о Жизни, включая смежные дисциплины, в том числе находящая применение для прикладных задач.

Амплификация НК протекает под действием фермента – ДНК полимеразы, и заключается в полимеризации цепей НК, которая может быть выражена следующим уравнением:



При этом выделяющийся пирофосфат вступает в реакцию с присутствующими в растворе ионами магния, образуя нерастворимую в воде соль, выпадающую в осадок:



На этом свойстве основана детекция результатов амплификации ДНК, что особенно удобно контролировать в LAMP-реакции благодаря высокому коэффициенту размножению.

Специфичность амплификации обеспечивается праймерами, представляющими собой относительно короткие участки одноцепочечной ДНК в виде химическим путем синтезированных олигонуклеотидов.

Например, олигонуклеотид длиной 20 звеньев может иметь 1 099 511 627 776 ( $10^{12}$ ) комбинаций перестановок четырех азотистых оснований, подчиняясь формуле  $4^n$ , где 4 – нуклеотиды А, С, G и Т, а n – длина цепи. Таким образом, такой олигонуклеотидный праймер с уникальной последовательностью способен отжечься с образованием водородных связей между парами азотистых оснований при определенной температуре только на полностью комплементарном ему участке, которых, кроме искомого целевого в геномах исследуемых организмов, в том числе в силу теории вероятности, быть больше не должно, если не принимать во внимание возможные дубликации некоторых участков ДНК, возникающие за счет различных механизмов.

Для предложенной в середине 1980-х гг. полимеразной цепной реакции (ПЦР) требуется минимум два праймера (рисунок 1), выступающих в качестве так называемых прямого и обратного и отжигающихся на мишени на некотором расстоянии друг от друга (Saiki et al., 1985; 1988). При этом нужно оговориться, что в некоторых вариантах ПЦР, «обходящихся» в реакционной смеси одним праймером, типа RAPD-анализа, этот единственный праймер одновременно служит как прямым, так и обратным.

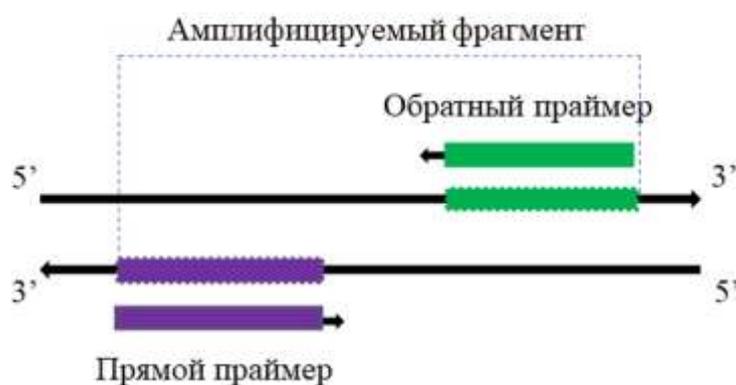


Рисунок 1 - Схема расположения мест отжига праймеров на мишени в ПЦР

Как можно видеть из рисунка 1, амплифицируемый фрагмент ограничен прямым и обратным праймерами, и получил обозначение «ампликон» (“amplicon”) по предложению К.Мюллиса, который сообщил,

что не он сам придумал это слово, а услышал его на конференции, и оно ему понравилось (Mullis, 1991). Ранее термином “amplicon” называли некую векторную конструкцию, усиливающую молекулярное клонирование (Spaete, Frenkel, 1982). Праймеры обеспечивают наработку ампликонов в геометрической прогрессии, упрощенно описываемой формулой  $N=2^n$ , где  $N$  – количество молекул целевого ампликона,  $n$  – число циклов ПЦР.

Выбор правильной (оптимальной) температуры отжига праймеров для обеспечения специфичности и эффективности ПЦР крайне важен. При установлении заниженной температуры возрастает вероятность протекания неспецифического отжига праймеров не на полностью комплементарных участках ДНК и следовательно возникновение ложно-положительных результатов, тогда как при установлении завышенной температуры может иметь место либо низкая эффективность амплификации, либо ее полное отсутствие, что грозит получением ложноотрицательных результатов.

ПЦР – процесс, регулируемый сменой температур, и поэтому требуется наличие специальных дорогостоящих приборов – ДНК-термоциклеров. При этом смены температур в реакционном блоке происходят не мгновенно, и это ведет к искусственному сдерживанию амплификации. Все эти этапы начинаются или достигают максимума лишь по достижении нужной температуры. Таким образом, ПЦР, как и некоторые другие реакции амплификации нуклеиновых кислот, регулируемые сменой температур, фактически больше «стоят» чем «идут». В этой связи представляют интерес изотермические реакции амплификации, идущие при одной температуре и всегда с максимально возможной в данный момент скоростью, определяемой кинетикой работы фермента и наличия в должном количестве в реакционной смеси других ингредиентов, в том числе праймеров. То есть при проведении таких реакций не происходит искусственного сдерживания работы фермента, что весьма важно для ускорения всего процесса амплификации. Другим важным моментом является то, что не требуются специальные ДНК-термоциклеры, обеспечивающие смену температур.

Если в ПЦР новые одноцепочечные последовательности, пригодные для отжига на них праймеров, образуются под действием высокой температуры, приводящей к денатурации цепей ДНК, то в изотермических реакциях это достигается иначе, в том числе за счет использования особых ДНК-полимераз, обладающих ферментативной активностью, способной вытеснять встречающиеся на пути старые цепи ДНК, в том числе благодаря специальному устройству праймерных систем.

Для дизайна ПЦР-праймеров написано множество, в том числе специализированных под разные задачи компьютерных программ, осуществляющих поиск в анализируемой ДНК или РНК подходящих участков и оценивающие различные параметры таких последовательностей. В качестве подтверждения этого можно сослаться на некоторые обзорные статьи (Чемерис и др., 2016; Kalendar et al., 2017; Kõressaar et al., 2018; Guo et al., 2021) и целые книги, посвященные программам дизайна праймеров в ПЦР – “PCR Primer Design” 2007 и 2022 гг. издания (Yuryev, 2007; Basu, 2022).

## **1.2. Петлевая изотермическая амплификация**

Альтернативой ПЦР и второй по популярности реакцией детекции специфичных фрагментов нуклеиновых кислот является метод петлевой изотермической амплификации (LAMP-реакция), разработанный еще в 2000 г. (Notomi et al., 2000), который в настоящее время «отвоевывает» себе все большее место в диагностике инфекционных заболеваний. Это связано, в том числе, с внезапным появлением новой коронавирусной инфекции SARS-CoV-2, которая в течение ряда лет заставляла обращать на себя пристальное внимание ученых различных специальностей, особенно тех, чьи исследования ранее лежали в смежных областях, включая молекулярную диагностику других этиологических агентов. Да и ожидания новых пандемий с пока непонятными этиологическими агентами вирусной природы

заставляет продолжать работу над улучшением методов детекции нуклеиновых кислот, среди которых LAMP-реакция находится на вполне почетном втором месте.

LAMP - одна из многих изотермических реакций для амплификации и детекции специфических фрагментов нуклеиновых кислот с экспоненциальным накоплением продуктов. Некоторыми преимуществами петлевой изотермической амплификации можно считать ее относительную простоту выполнения, скорость, специфичность и чувствительность, экономическую эффективность, высокую производительность. Кроме того, нет необходимости в проведении денатурации, амплификация протекает непрерывно в изотермических условиях, эффективность амплификации высока, возможна амплификация РНК-мишеней без этапа обратной транскрипции.

LAMP-амплификация протекает при постоянной температуре (обычно 60 – 65 °С), что исключает необходимость использования термоциклера (как в случае традиционной ПЦР). Кроме того, реакционная система устойчива к действию многих ингибиторов, мешающих той же ПЦР (Francois et al., 2011). Следует заметить, что все изотермические реакции амплификации нуклеиновых кислот искусственно не сдерживаются сменой температур, требующимися для ПЦР, и все время идут с максимально возможной в тот момент для используемого(ых) фермента(ов) скоростью, что обеспечивает их быстроту. Другое преимущество заключается в увеличенной специфичности этой реакции (LAMP) ввиду того, что необходимым условием ее успешного протекания является отжиг как минимум четырех праймеров, два из которых несут к тому же двойные места отжига. Однако такое увеличенное количество праймеров и их большая длина одновременно является и некоторым недостатком этого метода. В ряде случаев довольно критичным параметром является расстояние между отжигающимися (крайними) праймерами, и если оно велико, то существует вероятность, что в анализируемом образце в силу разных причин молекул нуклеиновых кислот

такого размера (это больше касается РНК) может и не оказаться, что приведет к ложно-негативному результату. Причем для проведения петлевой амплификации требуется присутствие в анализируемом образце фрагментов ДНК или РНК с минимальным размером около 200 нуклеотидов (с учетом обычной используемой дополнительной пары праймеров), что не так уж и мало. В то же время для проведения ПЦР достаточно наличия фрагментов ДНК или РНК размером всего около 40 нуклеотидов (Гарафутдинов и др. (Garafutdinov et al.), 2015; Garafutdinov et al., 2017). При этом считается, что LAMP-реакция по крайней мере, на порядок чувствительнее ПЦР. Так, в одной из работ, сообщается, что LAMP оказался чувствительнее ПЦР в 10 раз (Chen et al., 2011). Другими авторами обнаружено, что LAMP чувствительнее ПЦР в 100 раз (Nkere et al., 2018) и даже в 1000 раз (Wang et al., 2013). К тому же в определенных вариантах возможна даже просто визуальная оценка произошедшей амплификации.

В работе (Biswas et al., 2014) проведен сравнительный анализ метода изотермической амплификации LAMP и широко используемых методов стандартной ПЦР. Метод LAMP обладает высокой чувствительностью и эффективностью, имеет больше преимуществ, чем недостатков, по сравнению с ПЦР. Авторы делают вывод, что LAMP представляет собой простой, быстрый и высокоэффективный метод с превосходной специфичностью и может быть широко применен в клинической диагностике, мониторинге окружающей среды, оценке качества пищевых продуктов и здоровья человека (таблица 1) (Kitchen et al., 2012).

Как уже говорилось выше, выделение большого количества пирофосфата в ходе LAMP-реакции позволяет вести визуальную детекцию процесса амплификации с помощью некоторых красителей, в том числе являющихся рН-индикаторами и обходиться без дорогостоящего оборудования, что оказывается пригодным для проведения так называемых «анализов по месту лечения» или полевых экспериментов.

Таблица 1 – Сравнение LAMP-амплификации и ПЦР.

Свойства	LAMP	ПЦР
Преимущества	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Нет потребности в дорогостоящем термоциклере, т.к. реакция выполняется в изотермических условиях;</li> <li>– Легко выполняется в полевых условиях с использованием недорогой водяной бани или нагревательного блока либо нагревателей иных типов;</li> <li>– Высоко специфичная и эффективная амплификация, благодаря использованию петлевых праймеров;</li> <li>– Детекция в реальном времени и количественное измерение с использованием недорогого прибора</li> <li>– Подтверждение успеха реакции визуальным наблюдением по мутности или изменению цвета с использованием флуоресцентных красителей;</li> <li>– Менее чувствительна к ингибирующим веществам, присутствующим в биологических образцах</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Широко используемый молекулярный инструмент;</li> <li>– Детекция в реальном времени и количественное определение</li> </ul>
Недостатки	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Чувствительность к ложноположительным результатам из-за переноса или перекрестного загрязнения;</li> <li>– Сложный дизайн праймеров, требующий программного обеспечения;</li> <li>– Требование двух длинных праймеров</li> <li>– Чувствительность реакции не только к 3'-концам праймеров FIP и VIP, но и к их 5'-концам</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Более затратный по времени способ;</li> <li>– Требуются системы термоциклирования</li> </ul>

### 1.2.1. Дизайн праймеров в LAMP

В оригинальной статье 2000 г. (Notomi et al., 2000) было предложено использовать два внешних F3 (Forward) и B3 (Backward), а также два внутренних праймера FIP (Forward Inner Primer) и VIP (Backward Inner Primer), причем последние несли каждый по паре мест отжига F1c / F2 и B1c / B2 соответственно. Прямой и обратный праймеры F3 и B3 необходимы лишь для образования одноцепочечной амплифицируемой ДНК и требуются

только на начальном этапе и потому берущееся в реакцию их количество заметно меньше, чем других прямых и обратных праймеров FIP и VIP.

Чуть позже авторы метода (Nagamine et al., 2002) предложили его усовершенствованную версию, предполагающую использование уже 6 праймеров, специфичных к 8 участкам целевого фрагмента (рисунок 2). Еще два петлевых праймера Loop Primer B и Loop Primer F должны быть комплементарны последовательностям между участками F1 и F2, а также B1 и B2. Они отжигаются на одноцепочечных участках образующихся петель ДНК гантелеобразных структур и становятся дополнительными центрами инициации полимеризации со смещением цепи.

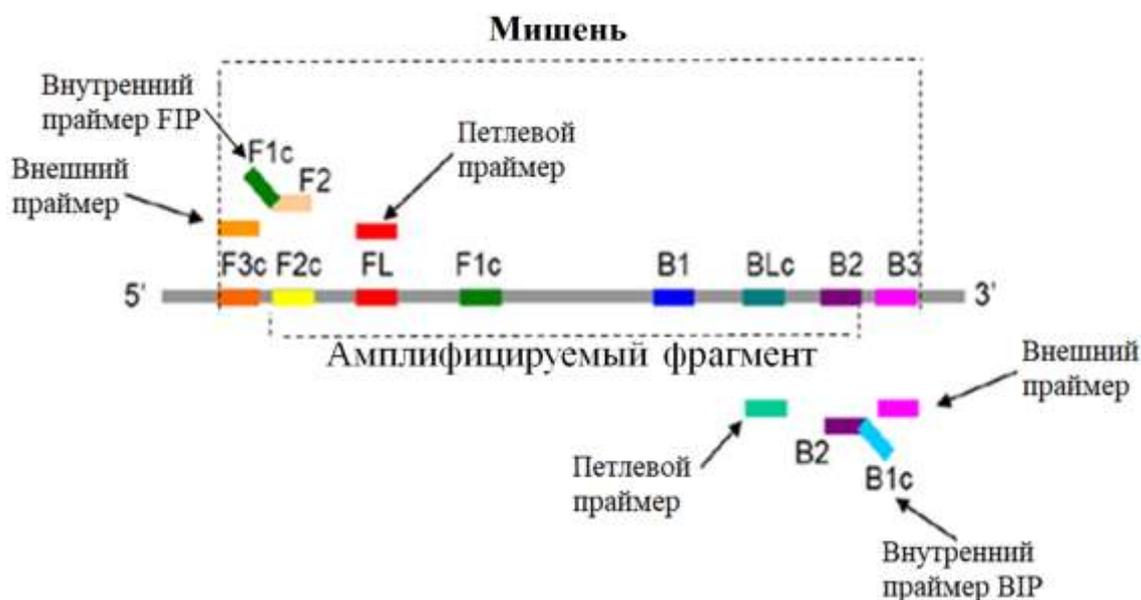


Рисунок 2 - Схема расположения LAMP-праймеров  
(представлен вариант, описанный в (Notomi et al., 2000))

Впоследствии другими авторами помимо loop-праймеров также, с целью ускорить процесс амплификации, было предложено использовать stem-праймеры, отжигающиеся на иных местах - на участках между прямым и обратным праймерами FIP и VIP (Gandelman et al., 2011). Затем были предложены и другие усовершенствования праймерной системы LAMP (Martineau et al., 2017; Ding et al., 2019). В первой работе так называемые

swarm праймеры частично или полностью перекрывались с праймерами F1 и B1. Во второй работе сообщалось о LAMP-амплификации с «двойным праймированием» («самопраймирование» и «парное праймирование пар»), которую авторы называли DAMP. Недавно отечественными учеными этот вариант LAMP-реакции был с успехом использован для детекции бактериальных агентов, вызывающих менингит – *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitides*, *Streptococcus pneumoniae* (Shkodenko et al., 2024). Предложено также использовать дополнительные праймеры PI (F2 и B2), являющиеся частью внутренних праймеров (Oscorbin et al., 2024). Но при этом они все не сопровождались разработкой программ дизайна соответствующих праймеров. Нельзя обойти вниманием использование в LAMP-реакции праймеров не с обычными фосфодиэфирными, а с фосфотиоатными межнуклеозидными связями, что позволило снизить температуру и ускорило процесс амплификации (Cai et al., 2018). Уделено внимание и внешним праймерам, сделав их также составными и внося в них полидезоксизинозинный мостик (Lamas et al., 2023).

Отдельный интерес вызывают публикации, в которых сообщается об использовании множественных внутренних праймеров в виде разных FIP и VIP. Впервые множественные внутренние FIP и VIP праймеры для проведения LAMP-реакции были предложены в 2015 г., что позволило этот подход называть как MIP-LAMP (Multiple Inner Primers), причем вместе с петлевыми праймерами и внешними праймерами число мест отжига для них на мишени составило уже 14 (Wang et al., 2015). Чуть позже эти же авторы, сохранив общий принцип мест отжига праймеров назвали этот метод как MCDA (Multiple Cross Displacement Amplification) и при этом было еще одно новшество в виде использования рестрикционной эндонуклеазы, разобщающей флуорохром и его гаситель для детекции результатов амплификации в режиме реального времени (Wang et al., 2016). В своей следующей работе они визуализацию продуктов MCDA вели путем хроматографического биосенсора (Wang et al., 2017).

Для детекции SARS-CoV-2 другие авторы разработали схожий с первоначальным подходом с множественными внутренними праймерами MIPLAMP метод (He et al., 2022). Фактически было использовано по два FIP и VIP праймера, что приводило к образованию двух гантелепообных структур, разного размера, что, по мнению авторов, ускорило процесс детекции, но при этом размер мишени тоже заметно увеличился. Собственно они исследовали этот метод и с тремя парами FIP и VIP праймеров, но при этом отметили, что образуются ложно-положительные результаты, вызываемые образованием праймерных димеров. В 2023 г. вышла еще одна статья, в которой для усиления эффективности амплификации в ходе LAMP-реакции была применена дополнительная пара праймеров FIP2 и VIP2 (Lamalee et al., 2023). В итоге вместо 8 мест отжига праймеров потребовалось таковых уже 12, что заметно увеличило длину мишени, что чревато проблемами при исследовании старых или подверженных разрушительному воздействию образцов.

Неким вариантом использования множественных внутренних праймеров можно LAMP-реакцию с применением SLPs (Stem loop primers), отличием которой было присутствие в праймерах SLP1, SLP2 и SLP3 по четыре зоны в каждом, три из которых повторяли VIP и FIP(1) и FIP(2), а четвертые зоны отжигались на мишени и тем самым в LAMP-цикл входило две отличающиеся по длине dumbbell структуры, что обеспечивало некоторое ускорение процесса амплификации (Liu et al., 2022).

Если в ПЦР участок ДНК, ограниченный подобранными праймерами, служит мишенью и совпадает по размеру с нарабатываемым в ходе амплификации ампликоном, то в LAMP ситуация иная. Так, мишенью в целом выступает фрагмент ДНК, ограниченный праймерами F3 и B3, а одинарным размером ампликонов можно считать участок ДНК между 5'-концами праймеров FIP и VIP. При этом в ходе LAMP амплификации происходит постоянное увеличение размеров нарабатываемых фрагментов ДНК. В связи с принципиальными отличиями между ампликонами в ПЦР и

продуктами наработки в ходе LAMP-амплификации, разными группами авторов было предложено ввести название “lamplicons” или “LAMPlicons” (Yang et al., 2012; 2013; Ahsan et al., 2017; Suprun et al., 2025). Однако широкого использования это слово пока не получило, но мы здесь им будем пользоваться.

В LAMP-реакции в качестве матрицы можно использовать и РНК, если добавить в реакционную смесь обратную транскриптазу. Такой вариант метода называется RT-LAMP (reverse transcription LAMP). Позднее компания New England Biolabs разработала версию 3.0 Bst ДНК-полимеразы, обладающую ревертазной активностью и исключаящую необходимость использования в реакции еще одного фермента.

### *1.2.2. Структура продуктов LAMP*

Происходящие процессы при LAMP амплификации приводят к формированию на одном из этапов гантелеподобных (dumbbell) структур, которые можно считать неким ядром данной реакции и обеспечивающие дальнейшее самопраймирование и эффективное размножение ДНК, в результате чего возникают гетерогенные продукты разной (увеличивающейся) длины, что нагляднее всего представлено в анимации фирмы Eiken Chemical Co (<https://loopamp.eiken.co.jp/en/lamp/0211.html>) и в видео фирмы New England Biolabs (<https://international.neb.com/products/m1800-warmstart-colorimetric-lamp-2x-master-mix-dna-rna#Product%20Information>).

К сожалению, упомянутые сайты не дают полного представления о происходящих событиях в ходе LAMP-реакции. К настоящему времени согласно базе данных PubMed с ключевыми словами ‘lamp’ AND ‘primer’ (для исключения работ, в которых упоминается осветительная лампа) находится свыше 2000 экспериментальных статей и более четырех десятков обзоров, но при этом публикаций, где бы рассматривались теория метода, типы лампликонов, характер их накопления всего четыре. И лишь две из них

посвящены преимущественно вопросам протекания LAMP-реакции и типам образующихся лампликонов.

Так, только через полтора десятилетия после того как этот метод был предложен вышла статья, в которой авторы разработали математическую модель этой реакции, отметив, что насколько им известно это первая публикация такого рода (Subramanian, Gomez, 2014). Собственно так и было. При этом те авторы ограничились тем, что построили S-образную кривую Ричарда и оценили размножение лампликонов во времени, не вдаваясь в их типы. Следующая подобная работа появилась лишь спустя пять лет (Gordon et al., 2019). Наконец в 2020 г. индийские авторы взяли на себя смелость вычленив отдельные типы лампликонов и охарактеризовать их поведение в ходе LAMP-амплификации (Kaur et al., 2020). Причем было отмечено, что это первая работа, в которой построена стехиометрическая и псевдокинетическая модель, способствующая лучшему пониманию LAMP-реакции за счет классификации нарабатываемых в ее ходе продуктов (ампликонов, как они их называли), которые были подразделены ими на четыре категории – SL (single loop), T (terminated), SS (single-stranded) и PDS (partially double-stranded), сопроводив некоторые из них римскими цифрами – I, II и III. Это позволило разработать некую схему протекания LAMP-реакции, до некоторой степени объясняющую последовательность событий, но далеко не полную.

В 2022 г. вышла еще одна статья, в которой была использована иная аббревиатура образующихся продуктов в ходе LAMP-реакции (Savonnet et al., 2022). При этом авторы заметили, что эта тема только недавно привлекла внимание ученых и привели ссылки на те три статьи, упомянутые нами выше. Было также отмечено, что теоретическая основа проведения LAMP-амплификации будет способствовать оптимизации экспериментов, сократив время на подбор нужных параметров. Нужно сказать, что данная работа была не только теоретической, но и экспериментальной, в которой авторы провели вторую стадию LAMP-реакции, начиная с гантелеподобных структур, назвав

ее IDEA (isothermal dumbbell exponential amplification). Соответственно мишень – она же матрица в их экспериментах имела следующий вид – 5'-F1c-F2-F1-B1c-B2c-B1-3'. Возникающие структуры они обозначили как Short Dumbbell, Middle Dumbbell, Long Dumbbell, все различия которых заключались в разной протяженности небольших дополнительных нуклеотидных последовательностей в участке между зонами FIP и VIP. В результате самопраймирования исходной шпильки (Initial Dumbbell) образовывалась Hairpin B2c = Hp1b. Через несколько смещений разных цепей возникала комплементарная ей шпилька, которую они назвали Hairpin 1 F2c = Hp1f. В дальнейшем авторы сконцентрировали свое внимание на концентрациях различных компонентов реакции и дали ряд рекомендаций практикам для улучшения протекания LAMP-реакции.

Помимо чувствительности любой реакции амплификации, есть еще и не менее важный показатель - ее специфичность. И здесь к LAMP амплификации в последнее время стали появляться вопросы, в том числе из-за возникновения так называемых праймерных гомо- и гетеродимеров, исключить которые в этой реакции сложнее, чем в ПЦР ввиду большего числа используемых праймеров и их увеличенной длины (Meagher et al., 2018, Hardinge et al., 2019, Бодулев и др., 2020). Несмотря на то, что казалось бы повышенная специфичность данной реакции обеспечивается за счет запрограммированного увеличения числа мест отжига праймеров, поскольку два из них несут в себе по два места отжига каждый (итого 8 мест отжига против обычных двух при ПЦР), в реакционной смеси могут происходить и иные процессы, напрямую не связанные с отжигом праймеров на намеченных местах матрицы и это убедительно показано с помощью цифровой LAMP амплификации (Rolando et al., 2020). Причина заключается в способности строить цепи ДНК спонтанно, используя в этой реакции некоторые ДНК-полимеразы, обладающие цепь-вытесняющей активностью.

### *1.2.3. Применение LAMP*

Пожалуй, сейчас вторым по масштабам применения для диагностических целей (хотя и с огромным отрывом) является петлевая амплификация LAMP, разработанная в 2000 г. (Notomi et al., 2000). Как уже говорилось выше, ее важным преимуществом является изотермический характер протекания, не требующий использования дорогостоящих ДНК-термоциклеров, и позволяющий проводить анализы с простой визуальной детекцией результатов даже «тестирование на месте оказания медицинской помощи» - РОСТ (Point-of-Care-Testing).

Учитывая ряд преимуществ, описанных выше, LAMP не мог не быть использован для выявления коронавирусов. Так, японская компания Eiken Chemical Co. еще в 2003 году выпустила специальный набор реагентов Loopamp SARS Coronavirus Detection Reagent для выявления «старого» SARS-CoV. Его чувствительность составляла 10 копий вирусной РНК, а время реакции - 45 минут. С помощью того набора была проведена экспериментальная работа по выявлению SARS-CoV (Poon et al., 2005). После появления коронавируса MERS-CoV он также выявлялся с помощью LAMP (Shirato et al., 2014; Huang et al., 2018). В пандемийные годы нового коронавируса SARS-CoV-2 к методу LAMP обратились опять, и многие компании освоили выпуск соответствующих наборов. В статье (Nguyen et al., 2022) сравнивались методы ПЦР и LAMP для выявления COVID-19 и было показано, что последний метод имеет много преимуществ. Другие авторы также сравнили ПЦР с LAMP-амплификацией, где так же LAMP оказалась значительно чувствительнее, чем ПЦР. В одном из исследований визуально наблюдаемое изменение цвета реакционной смеси в ходе LAMP-амплификации указывало на наличие вирусного материала SARS-CoV-2 в анализируемом образце (Zhang et al., 2020). Потенциальное использование LAMP для визуальной детекции SARS-CoV-2 в анализах Point-of-Care-Testing, основанных на комплексе праймеров к мишени RdRp, описано другими авторами (Lu et al., 2020). Другой метод колориметрической

детекции результатов LAMP по изменению цвета фенолового красного, индикатора pH, добавляемого в реакционную смесь, был использован для выявления SARS-CoV-2. Причем в качестве амплифицируемого фрагмента был выбран участок гена нуклеокапсидного белка (Baek et al., 2020). Время реакции составляло от 30 до 60 минут, а чувствительность детекции -  $10^2$  мишени. Комбинация двух реакций, RPA (рекомбиназно-полимеразной амплификации) и LAMP, получившая название Penn-RAMP, еще больше повысила чувствительность такой диагностики, что позволило успешно выявлять SARS-CoV-2 (El-Tholoth et al., 2020). И это публикации только первого года пандемии. В дальнейшем LAMP-реакция для детекции SARS-CoV-2 не только продолжала использоваться, но и предлагались ее различные модификации, что можно видеть из ряда специализированных обзоров, в том числе отечественных авторов (Хафизов и др., 2021; Li et al., 2022; Choi et al., 2023; Wang et al., 2025).

Учитывая лавину работ по этой тематике, остановимся лишь на некоторых статьях последних лет методического плана, а также на публикациях, где проводилось сравнение методов ПЦР и LAMP для обнаружения SARS-CoV-2 в клинических образцах, а также в сточных водах, в воздухе и на различных поверхностях.

Ввиду изотермичности LAMP-реакции предложено немало миниатюрных микрофлюидных устройств, обеспечивающих как быстроту анализа, так и его высокую чувствительность при детекции SARS-CoV-2 в том числе с применением смартфонов (García-Bernalt Diego et al., 2022; Meyers et al., 2023; Papamatthaiou et al., 2023; Guo et al., 2024; Tang et al., 2024), в сточных водах (Boza et al., 2024) и др. Во многих статьях, описывающих проведение анализов на предмет выявления SARS-CoV-2, в которых сравниваются ПЦР и LAMP-реакция, включая коммерческие наборы, отмечается как превосходство последней по ряду параметров или сопоставимые значения по чувствительности (Erdem et al., 2023; Akter et al., 2024; Pourakbari et al., 2024; Takeuchi et al., 2024; Turbawaty et al., 2024; Zhang

et al., 2024). Помимо ПЦР в реальном времени с LAMP-реакцией при детекции SARS-CoV-2 сравнивали и вложенную и цифровую ПЦР и в обоих случаях результаты оказывались сопоставимыми (Shishkova et al., 2024; Spiteri et al., 2025). Другие авторы использовали непосредственно цифровую LAMP-реакцию, при выполнении которой хватило 8 минут, чтобы обнаружить SARS-CoV-2, из чего авторы сделали вывод, что этот метод вполне годится для проведения «анализов по месту лечения» (Yuan et al., 2024). Было показано, что с помощью LAMP-реакции успешно обнаруживаются такие варианты SARS-CoV-2 как Бета, Дельта, Омикрон (Law et al., 2023). Отмечается также, что детекция SARS-CoV-2 с помощью LAMP может проводиться без этапа экстракции РНК коронавируса (Rivas-Macho et al., 2023).

Для обнаружения с помощью LAMP молекул микроРНК применяются несколько отличающиеся от классического варианта системы праймеров и готовых матриц. В самом простом варианте микроРНК использовалась в качестве внешнего праймера, например вместо F3, обеспечивающего образование одноцепочечной ДНК и возникновение из нее гантелеподобной структуры, пригодной для дальнейшего самопраймирования и отжига на ней новых порций праймеров (Li et al., 2010). При этом было необходимо синтезировать любую подходящую матрицу, содержащую места для отжига работающих (подобранных ранее отдельно) праймеров FIP и VIP, главным условием для которой (матрицы) является отсутствие гомологии с геномной ДНК исследуемого организма и микроРНК, кроме участка мишени, на котором и должна отжигаться эта самая микроРНК. Схожую работу выполнили другие авторы, назвавшие свой метод детекции микроРНК ТТ-LAMP (Target-triggered) (Sun et al., 2017).

Иной подход для детекции микроРНК с помощью LAMP амплификации основан на лигировании синтезированных двух «полугантелей» (которые можно условно назвать - FIP и VIP) на поддерживающей матрице, приготовленной на основе микроРНК путем ее

удлинения с помощью poly(A) РНК полимеразы, отжиг на достроенном участке олиго(dT) праймера и синтез кДНК, что приводило к образованию пригодной к самопраймированию полноценной гантелеподобной структуры (Du et al., 2016). Данный подход напоминает лигирование так называемых С-проб на поддерживающих матрицах при проведении Rolling Circle Amplification (RCA), что довольно недавно детально рассмотрено (Гарафутдинов и др. (Garafutdinov et al.), 2021b). Схожий подход к обнаружению микроРНК с помощью LAMP, сопряженной с лигированием «полугантелей» на матрице РНК применили еще одни авторы, но для повышения чувствительности метода они использовали дополнительно CRISPR/Cas технологию для разрушения лампиконов нуклеазой Cas12a, поскольку внедрили в матрицу так называемый РАМ-участок и использовали специальный флуоресцентный зонд (Zhang et al., 2021). В еще одной работе для детекции микроРНК также применялся этап обратной транскрипции с использованием специальной пробы SL (Stem-Loop), после чего «в дело вступала» PS-Н проба (Phosphorothioate Hairpin) и возникала гантелеподобная структура для отжига на ней FIP и VIP праймеров, регистрация результатов LAMP амплификации велась с помощью OSD пробы с временным гашением флуоресценции. Особенностью данного подхода названного как RT-THSP-LAMP (Terminal Hairpin formation and Self-Priming) было использование ДНК структур с фосфотиоатными связями, облегчающими отжиг и способствующими самопраймированию (Abdulla Al-Maskri et al., 2020).

### **1.3. Подбор LAMP-праймеров**

LAMP - высокоспецифичная реакция амплификации нуклеотидных последовательностей за счет большого количества праймеров и еще большего количества мест их отжига на мишени. Но это же является и определенной проблемой данной реакции, ведь известно, что чем больше

праймеров участвует в реакции, тем сложнее подобрать их так, чтобы между ними не образовывались различные димеры. Кроме того, в случае LAMP-амплификации длина некоторых праймеров увеличивается вдвое, что повышает вероятность образования вторичных структур, которые могут в той или иной степени мешать реакции. Или, что еще хуже, они могут быть удлинены ДНК-полимеразой, что приведет к неожиданным последовательностям нуклеотидов в реакционной смеси и неправильным результатам. В ряде работ уделялось внимание неспаренным нуклеотидам между мишенями и праймерами в LAMP (Peurefritte et al., 2008; Wang, 2016). Допустимы от одного до трех в средней части праймеров. Более того, могут быть случаи, когда такие неспаренные праймеры неизбежны.

Ложноположительные результаты могут возникать из-за загрязнения рабочих помещений, инструментов и оборудования, а также реагентов. Использование вариантов детекции LAMP-амплификации без вскрытия пробирок значительно снижает риск контаминации. Тем не менее, для тех случаев, когда его нельзя исключить, был предложен метод деградации ампликонов LAMP с помощью урацил-ДНК-гликозилазы, проводимый в одной пробирке (Hsieh et al., 2014). Для этого, при проведении LAMP-амплификации в реакционную смесь первоначально добавляют дУТФ, что практически никак не влияет на детекцию целевых продуктов, но позволяет начать новую амплификацию с выщеплением урацил-ДНК-гликозилазой остатков урацила в возможных загрязнениях в течение 5 минут при комнатной температуре. Это в свою очередь приводит к образованию в таких матрицах безазотных участков, которые становятся неспособными к копированию *Bst*-полимеразой, которую также сразу добавляют в реакцию и «ждут» повышения температуры до 60-65°C. Другой метод устранения контаминации от предыдущих реакций был предложен путем введения зон рестрикции эндонуклеазы *GsuI* 6 в составные праймеры FIP и VIP в области между праймерами первого и второго уровней, таким образом, расщепляя

потенциальные ампликоны, которые могут попасть в новую реакцию (Ma et al., 2017). Авторы назвали этот метод PE-LAMP (Primer Enzymatic).

### *1.3.1. Программы подбора LAMP-праймеров*

Подбор праймеров для LAMP представляет собой нетривиальную задачу и требует разработки специальной компьютерной программы с должным функционалом, возможностью расширенного подбора праймеров, удобным дружелюбным интерфейсом и с учетом рекомендуемых условий. При разработке программ поиска праймеров для ПЦР применяются такие методы как метод Монте-Карло, цепи Маркова (Kitchen et al., 2012), алгоритм, логарифмической аппроксимации (Konwar et al., 2004). Рекомендовалось для дизайна праймеров использование эвристического (Pearson et al., 1995), иерархического подходов (Wei et al., 2003), статистического моделирования (Yang et al., 2009). В последнее время широкое распространение получили алгоритмы самообучения для дизайна праймеров (Cheng, 2014). Во многих статьях для дизайна праймеров предлагалось использовать генетический или меметический алгоритмы (Yang et al., 2009, Chen et al., 2003, Wu et al., 2004, Png et al 2006, Chuang et al., 2013, 2015).

Если для дизайна ПЦР-праймеров предложены сотни различных компьютерных программных средств, то для дизайна LAMP-праймеров их число не превышает десяти. Из них только две доступны онлайн, одна работает на операционной системе Linux. Эти программы имеют определенные ограничения и недостатки, например, по длине анализируемой нуклеотидной последовательности, не учитывают возможность образования димеров праймеров, что обуславливает недостаточно высокое качество праймеров. Следствием этого может стать получение недостоверных диагностических результатов. Таким образом, создание инструмента дизайна качественных наборов праймеров для проведения LAMP является актуальной задачей.

Для дизайна праймеров предназначенных для проведения различных видов ПЦР, как уже отмечалось выше, разработано более полутора сотен специальных компьютерных программ, тогда как для дизайна праймеров для LAMP-амплификации существует менее десяти подобных программ. И это при том, что подбор праймеров для LAMP несравнимо сложнее и не может быть осуществлен вручную.

Наиболее широкое применение получило бесплатное программное обеспечение PrimerExplorer (V5), разработанное японской компанией Eiken Chemical Co.LTD, Токио (<http://primerexplorer.jp/e>, 25.02.2025). Программа онлайн доступная и достаточно простая в использовании. Существует три режима подбора праймеров (Automatic Judgment, Normal, User Assignment). При выборе автоматического (Automatic Judgment) режима параметры автоматически выбираются из трех типов настроек на основе содержимого GC в целевой последовательности. Когда содержание GC составляет  $\leq 45\%$ , выбираются значения для AT богатой последовательности, когда  $GC \geq 60\%$ , для GC богатой последовательности, а когда содержание GC составляет от 45% до 60%, выбираются стандартные значения параметров. При обычном (Normal) режиме настроены все стандартные параметры по умолчанию. А при настраиваемом (User Assignment) режиме пользователь выбирает файл параметров, сохраненный на персональном компьютере пользователя, который будет использоваться в качестве условия подбора праймеров. Температура отжига праймеров рассчитывается для каждой области: около 65°C (64–66°C) для F1c и B1c, около 60°C (59–61°C) для F2, B2, F3 и B3, и около 65°C (64–66°C) для петлевых праймеров.

Это программное обеспечение генерирует наборы праймеров на основе информации о целевой последовательности, которая соответствует требованиям дизайна праймеров. Один набор праймеров содержит четыре праймера: FIP (Forward Inner Primer), F3 (Forward), BIP (Back Inner Primer) и B3 (Backward). Программа учитывает ключевые требования дизайна праймеров для LAMP, а именно: температуру отжига праймеров (используя

метод ближайших соседей), стабильность на концах каждого праймера, GC-состав и вторичную структуру. Учитываются так же расстояния между праймерами: от конца F2 до конца B2 – от 120 до 160 оснований; от 5'-конца F2 до 5'-конца F1 – от 40 до 60 оснований; от F2 и F3 – от 0 до 60 оснований.

Для загрузки целевой последовательности программа позволяет использовать следующие форматы: формат обычного текста (только последовательность), формат FASTA ([Fasta format \(msu.ru\)](http://Fasta_format(msu.ru))), 30.01.2025), формат GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), 22.02.2025). Подобранные наборы праймеров можно сохранить в виде файла Excel. Каждый праймер имеет название, положение 5' и 3' концов целевой последовательности, длину и температуру отжига праймеров. Перед использованием этого программного обеспечения необходимо активировать функцию Java и Java Script веб-браузера. Рабочее окно программы содержит краткую инструкцию пользователя. Авторы отмечают, что программой не предусмотрено изменение параметров для дизайна петлевых праймеров. Так же программа ограничена в длине целевой, анализируемой последовательности, до 2000 пар оснований.

LAMP Designer американской фирмы Premier Biosoft (<https://premierbiosoft.com/isothermal/index.html>), 22.02.2025), еще одна компьютерная программа дизайна наборов праймеров для LAMP ([LAMP :: Design primers for Loop-Mediated Isothermal Amplification \(premierbiosoft.com\)](http://premierbiosoft.com/LAMP_Design_primers_for_Loop-Mediated_Isothermal_Amplification)), 22.02.2025), позволяющая подбирать наборы как из четырех, так и из шести (с учетом петлевых) праймеров. Программа принимает последовательности, формате FASTA, GenBank, GenBank Like, dbSNP. LAMP Designer автоматически интерпретирует результаты поиска и избегает перекрестную гомологию с базой данных BLAST, для проверки на специфичность. Программа анализирует термодинамические свойства, рассчитывая температуру отжига, используя метрический алгоритм ближайших соседей. LAMP Designer является коммерческой программой и работает только в операционной системе Windows 7 и выше. Результаты

можно сохранить в формате \*.csv или \*.xls. Файл будет содержать все основные характеристики праймеров: а именно название праймера, саму последовательность, позиции вхождения, длину, температуру отжига, GC-состав.

Программное обеспечение FastPCR (Kalendar et al., 2014) финской фирмы Primer Digital Ltd (Kalendar et al., 2011, 2017), представляет собой интегрированную инструментальную среду, которая предоставляет комплексные средства для разработки любого вида праймеров для ПЦР (стандартные, мультиплексные, обратные, в реальном времени и т.д.), а так же подбирает праймеры для LAMP-амплификации. ПО анализирует процентное содержание GC и GA, генерирует случайные последовательности ДНК и определяет температуру отжига. Так же программа анализирует ферменты рестриционного типа I-II-III, проводит поиск или создает сайты рестрикции ферментов для анализируемых последовательностей. Инструмент рассчитывает физические свойства последовательности, включая длину, CG-состав, температуру отжига праймеров, молекулярную массу, оптическую плотность (OD), лингвистическую сложность последовательности, эффективность ПЦР с праймерами и обнаружение самодимеров. Расчет температуры отжига праймеров основывается на методе ближайших соседей для стандартных и вырожденных олигонуклеотидов. Программа принимает либо одну последовательность, либо несколько отдельных последовательностей ДНК в формате FASTA, в табличном формате (два столбца MS Excel или таблицы MS Word), EMBL, MEGA, GenBank, MSF, DIALIGN, BLAST Queue. Время работы программы пропорционально количеству ампликонов и размеру целевого участка. Интерфейс программы содержит меню, панели инструментов и ленту. Лента предназначена для того, чтобы помочь пользователю быстро найти команды, необходимые для выполнения задачи. Найденные праймеры могут быть сохранены в различных форматах, \*.rtf, \*.xls или \*.txt.

Программное обеспечение FastPCR может быть установлено исключительно на платформе Microsoft Windows с 2 ГБ ОЗУ и минимальное разрешение экрана 1280x800. FastPCR является коммерческой программой.

Следующая программа GLAPD (<https://github.com/jiqingxiaoxi/GLAPD>, 25.02.2025) - единственная программа, которая позволяет подбирать наборы LAMP - праймеров на основе всей нуклеотидной последовательности или же подбирает праймеры для целевого участка. GLAPD состоит из нескольких этапов: идентификация отдельных областей возможных праймеров; объединение отдельных праймеров в набор праймеров LAMP; проверка набора праймеров LAMP.

Базовый набор LAMP-праймеров содержит четыре синтетических праймера из шести областей праймеров, названных F3, F2, F1c, B1c, B2 и B3. Последовательности из F1c и F2 объединяются в один праймер FIP, а последовательности из B1c и B2 объединяются в другой праймер BIP. Дизайнер LAMP-праймеров на основе всей последовательности идентифицирует все области праймеров-кандидатов в эталонном геноме в соответствии с длиной праймера, содержанием GC-состава, температурой отжига (Tm), стабильностью и пр. Далее найденные праймеры объединяются в наборы и проверяются на специфичность. Наборы праймеров для LAMP могут содержать один или два петлевых праймера. Установлено, что температура отжига петлевых праймеров на 3°C выше, чем температура отжига F3, F2, B2, B3. Вторичная структура праймера проверяется с помощью использования термодинамических характеристик, аналогичного программе Primer3 (<http://primer3.ut.ee>, 22.02.2025) При этом конец каждого праймера проверяется для исключения симметричных последовательностей и гомополимеров. GLAPD использует настраиваемые параметры для идентификации областей праймеров в соответствии с содержанием GC в целевой области (между F3 и B3).

После прохождения всех проверок на экран будут выведены 10 наборов праймеров (по умолчанию). Либо же система автоматически остановится,

после того как GLAPD проверила все возможные наборы LAMP-праймеров. Выходные данные содержат последовательности, положения, длины праймеров и геномов, которые можно амплифицировать. Наборы праймеров LAMP не пересекаются. Авторы заявляют, что GLAPD можно использовать для дизайна праймеров любых организмов, даже в случае неизвестных участков в качестве входных данных. Результаты GLAPD аналогичны PrimerExplorer V5, так как вводятся те же последовательности. Эффективность GLAPD была подтверждена экспериментально. Реакцию LAMP проводили при 62°C в течение 60 минут с использованием термоциклера Veriti™ Dx. После реакции в раствор добавляли SYBR Green I, чтобы проверить вступление праймеров в реакцию. При положительном результате цвет раствора должен был стать зеленым, при отрицательном – оранжевым.

Однако GLAPD работает только в операционной системе Linux. Необходимы perl (высокоуровневый интерпретируемый динамический язык программирования общего назначения) и gcc (набор компиляторов для различных языков программирования). Так же вычисления программы возможно только в графическом процессоре видеокарты Nvidia при помощи CUDA ядер, для обеспечения более быстрой работы программы.

В августе 2020 года компания New England Biolabs выпустила программу NEB LAMP PrimerDesignTool (<https://lamp.neb.com/#/>, 25.02.2025), которую можно использовать для дизайна наборов как из четырех основных праймеров, так и с возможностью генерации петлевых праймеры для реакций LAMP.

Это приложение лучше всего использовать в современных веб-браузерах, совместимых со стандартами HTML5 и CSS3. Для работы инструмента должен быть включен Javascript. NEB LAMP позволяет загружать файлы формата FASTA, GenBank, так же есть возможность загрузить файл с последовательностью, вставить фрагмент или воспользоваться предложенными. Длина анализируемой последовательности

должна быть от 100 до 2000 нуклеотидов. Есть две возможности запустить программу: автоматический или указав начальные условия, на основе GC-состава, ионного состава реакционного буфера, который влияет на значения  $T_m$  праймера, длины праймеров, температуры отжига, стабильности праймера и расстояния между праймерами. Результат поиска праймеров можно загрузить в формате .txt (<https://lamp.neb.com/#!/help>, 25.02.2025). Это приложение отправляет пользовательские данные на серверы NEB для обработки. Данные целевой последовательности потребляются, но не сохраняются. Сгенерированные праймеры временно хранятся на серверах NEB, но очищаются один раз в час. NEB LAMP включает в себя код из Google Analytics, который может передавать анонимные данные об использовании (количество и время доступа к странице, IP-адрес пользователя, версию браузера пользователя и т. д.) в Google. Однако программа не учитывает повторы нуклеотидов в одном праймере и зачастую подбирает только один петлевой праймер, что не целесообразно для проведения LAMP. И так же не учитывает гомо- и гетеродимеры праймеров в одном наборе, что в свою очередь может привести к ненужным налипаниям и тем самым к ложным результатам.

Недолго была доступна программа Lamprim (<https://github.com/Maximato/lamprim>, 21.06.2020). Она выполняла поиск наборов праймеров по двум параметрам: для отдельного праймера и набора в целом. К первой группе относились: температура отжига, GC-состав, длина праймера, стабильность на 5' и 3'-конце. Температура отжига праймера для праймеров LAMP составляет 65°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) для F1c и B1c и 60°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) для F2, B2, F3 и B3. GC-состав должен быть в пределах от 40% до 60%. Оптимальная длина праймеров 18-22 пары оснований. Максимальное рекомендуемое значение изменения свободной энергии на концах праймеров 4 ккал/моль. К параметрам набора в целом относились: расстояние между праймерами, условия отторжения димеров и шпилек. Рекомендуемое расстояние между праймерами: «F3/F2» 0–60, «F2/F1» 20–40, «F1/B1c» 0–30. Если при

рекомендуемых параметрах не удавалось обнаружить ни одного набора праймеров, было необходимо расширить допустимые диапазоны. Если количество вариантов на первых этапах превышает 1000, была возможность установки более жестких параметров поиска праймеров.

Lamprim работала в двух режимах: дизайн праймеров (design) и анализ (analysis). После того, как все допустимые наборы были найдены, данные представляются в виде текстового файла. Программа была реализована на языке Python 3 и поддерживалась в Windows и Linux. Перед запуском программы необходима установка интерпретатор Python и библиотеки BioPython. Результатами программы являлись файлы в формате .pp и .mp, в которых содержались наборы праймеров, информация о расстоянии между праймерами, длина, GC-состав, температура отжига, стабильность 5' и 3' концов. Однако данная программа не подбирала петлевые праймеры, что является не маловажным условием для LAMP. Так же не имела визуализации готовых наборов и интерфейса для использования конечными пользователями.

Программа Electric LAMP (eLAMP), размещенная на сайте Ботанического сада Нью-Йорка рассчитана на электронную симуляцию LAMP (<https://www.nybg.org/files/scientists/dlittle/eLAMP.html>, 25.02.2025). Она лишь дает возможность пользователям тестировать предполагаемые праймеры LAMP на целевых последовательностях, предсказывая, с какими комплектами праймеров будет протекать амплификация (Salinas et al., 2012).

В статье, описывающей web-ресурс STITCHER, предназначенный для дизайна перекрывающихся праймеров для ПЦР (O'Halloran, 2015), упоминается возможность подбора праймеров для LAMP, но в следующей статье данных авторов, посвященной новой версии STITCHER 2.0 (O'Halloran et al., 2017) про LAMP уже не упоминается, как и на их сайте ([http://www.ohalloranlab.net/STITCHER\\_2\\_0/index.html](http://www.ohalloranlab.net/STITCHER_2_0/index.html), 25.02.2025) .

Некоторое время назад имелся доступный программный продукт LAVA (LAMP Assay Versatile Analysis), в котором дизайн праймеров был

основан на методе отбора праймеров Primer3, но, к сожалению, уже неработающий (Torres et al., 2011). При этом программа LAVA имела определенные возможности, в частности она могла воспринимать результаты множественного выравнивания нуклеотидных последовательностей родственных образцов длиной до 20 т.п.н. В цитируемой статье приводится сравнение подобранных LAMP-праймеров для стафилококка *Staphylococcus aureus*, показавшее что для кандидатного региона они оказались сильно совпадающими с праймерами, дизайн которых осуществлялся с помощью PrimerExplorer.

Отечественными авторами создан web-инструмент, предназначенный для выбора мишени и разработки таксон-специфических LAMP-праймеров MorphoCatcher (Shirshikov et al., 2019). MorphoCatcher представляет собой web-плагин для загрузки данных в уже упоминавшуюся программу PrimerExplorer после проведения множественного выравнивая ортологичных генов с помощью программы Clustal Omega, позволяя принимать во внимание полиморфные сайты и вести штаммо-специфичную амплификацию. На web-страницы этой программы (<http://morphocatcher.ru/>, 25.02.2025) имеется детальное руководство для проведения таких анализов, в котором для примеров в качестве объектов приведены бактериальные гены *hisC*, а также вирус PVY картофеля.

Недавно отечественными авторами опубликован краткий обзор, в котором они рассмотрели часть из выше упомянутых программ дизайна LAMP-праймеров, уделив внимание достоинствам и недостаткам существующих программ (Ptitsyn et al., 2024).

Отдельного внимания заслуживает база данных LAMPPrimerBank (<https://lampprimerbank.mathematik.uni-marburg.de/>, 25.02.2025) (Arabi-Jeshvaghani et al., 2023). Авторы сообщают, что они, в том числе вручную вносили в свою базу данных праймерные последовательности для детекции с помощью LAMP-реакции SARS-CoV-2 из оригинальных статей. В целом в данной базе данных содержатся информации по праймерным системам для

LAMP-реакций для более ста патогенов бактериальной и вирусной природы, среди которых «старые» коронавирусы человека HCoV-229E, HCoV-NKU1, HCoV-NL63, HCoV-OC43, а также коронавирус начала 2000-х гг. SARS-CoV и различные серотипы SARS-CoV-2 (Alpha, Beta, Delta, Gamma, Omicron).

Безусловно, наличие такой базы данных крайне важно для проведения диагностики с помощью LAMP-реакции уже известных патогенов, для которых праймерные системы были подобраны и опробованы в реальных экспериментах и диагностических исследованиях. Однако патогены и в особенности вирусы способны быстро мутировать, приводя к тому, что хорошо зарекомендовавшие себя системы праймеров могут перестать работать. Поэтому подбор новых праймеров никогда не потеряет своей актуальности. А поскольку для LAMP-реакций это далеко нетривиальная задача, то остро стоит необходимость использования программ дизайна таких праймерных систем. Соответственно и программ должно становиться больше, обладающих отличающимся функционалом, но для их создания необходимо применять подходящие математические или эвристические алгоритмы.

### *1.3.2. Алгоритмы поиска праймеров*

Задачу поиска праймеров в нуклеотидной последовательности можно сопоставить с задачей поиска подстроки в строке, где праймер будет являться подстрокой, а нуклеотидная последовательность строкой. Задача заключается в распознавании всех вхождений подстроки  $A$  в строке  $T$ . В случае первоначальной LAMP-реакции необходимо найти 6 подстрок, а в LAMP с использованием дополнительно петлевых праймеров - восемь подстрок в несколько более длинной строке.

Существует ряд алгоритмов, которые могут быть применены к решению данной задачи. Самым простым методом, который может быть использован в данном случае, является прямой поиск (Яркова и др., 2021). Сравнение происходит слева направо. Левый конец подстроки находится на

одной позиции с левым концом строки. «Сдвиг» подстроки на одну позицию происходит в случае несовпадения между подстрокой и строкой, или при полном совпадении всех элементов подстроки и строки (тогда необходимо обозначить участок полного совпадения). Поиск продолжается до достижения конца строки (рисунок 3).

Строка	A	G	C	A	G	A	G	A	G	C	A	G	C
Подстрока	A	G	C	A	G	C							
		A	G	C	A	G	C						
			A	G	C	A	G	C					
				A	G	C	A	G	C				
					A	G	C	A	G	C			
						A	G	C	A	G	C		
							A	G	C	A	G	C	
								A	G	C	A	G	C

Рисунок 3 - Схематичное изображение прямого поиска подстроки AGCAGC в строке. Красным цветом обозначены не совпавшие символы

Сложность алгоритма можно оценить как  $O(n \cdot m)$ , где  $n$  – длина подстроки  $A$ ,  $m$  – длина строки  $T$ .

Одним из классических алгоритмов поиска подстроки в строке является алгоритм Кнута-Морриса-Пратта. Это самый известный алгоритм с линейным временем для решения задач точного совпадения подстроки со строкой (<https://brestprog.by/topics/prefixfunction/>, 24.05.2023). Идея данного алгоритма заключается в том, чтобы максимально увеличить расстояния сдвига подстроки по строке, таким образом, сократив количество сравнений. Алгоритм работает в два этапа. На первом этапе создается одномерный массив  $\pi$ , в котором хранятся значения для префикс-функции. Эти значения позволяют определить, на сколько позиций можно сдвинуть подстроку  $A$  вдоль строки  $T$ . На данном этапе происходит работа только с подстрокой (Смит, 2006). На втором этапе проводятся сравнения подстроки со строкой и если символ в строке и соответствующий символ подстроки не совпали, то происходит соответствующий сдвиг подстроки  $A$  вдоль строки  $T$ . Если

символы совпадают, происходит проверка соседних справа символов (рисунок 4), иначе образ смещается на значение, соответствующее предшествующему не совпавшему элементу из массива  $\pi$ .

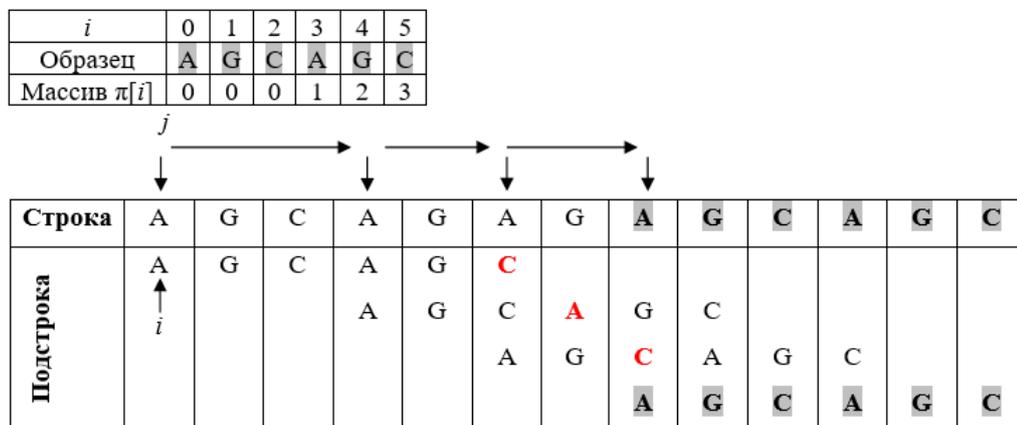


Рисунок 4 - Схема поиска подстроки AGCAGC в строке согласно алгоритму Кнута-Морриса-Пратта. Красным цветом обозначены не совпавшие символы

Или же можно произвести сдвиг подстроки таким образом, чтобы положение текущей позиции сравнения  $j$  совпадало с элементом подстроки, индекс которого равен значению  $\pi(i)$ . Сложность алгоритма Кнута-Морриса-Пратта линейно зависит от объёма входных данных и определяется как  $O(n+m)$ , где  $n$  – длина образца,  $m$  – длина строки  $T$  (Боровский, 2005).

Еще одним классическим алгоритмом поиска подстроки в строке является алгоритм Бойера-Мура. Он является самым быстрым алгоритмом среди известных классических алгоритмов общего назначения для поиска подстроки в строке или тексте (Ибремпашаев, 2011). Суть алгоритма Бойера-Мура аналогична алгоритму Кнута-Морриса-Пратта. Однако существенным различием является то, что просмотр совпадения ведется справа налево, другими словами, проверка начинается с последнего символа подстроки. Так же есть правило сдвига плохого символа, которое позволяет сдвигаться сразу на несколько позиций, значительно сократив время поиска. Пример поиска по алгоритму Бойера-Мура представлен на рисунке 5, в котором проведено



Строка: **G T A G C A G C T G A G C A G C A G C T C**

Образец: **A G C A G C**

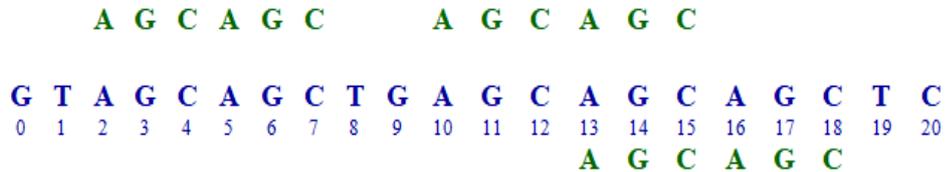


Рисунок 6 - Схема поиска подстроки в строке согласно алгоритму Рабина-Карпа

Сложность данного алгоритма можно оценить как  $O(n)$ , где  $n$  – это длина строки. Но для такого хорошего результата необходимо правильно выбрать хеш-функцию. В ином случае сложность алгоритма будет равна  $O(m \cdot n)$ , где  $n$  – длина строки (нуклеотидной последовательности),  $m$  – длина подстроки (праймера). Это и является одной из причин того, почему данный алгоритм не слишком широко используется (<https://habr.com/ru/articles/662678/>, 22.03.2023).

Для сравнения рассмотрен еще один алгоритм, алгоритм Ахо-Корасик, который позволяет искать сразу все вхождения. Данный алгоритм был предложен А.Ахо и М.Корасик в 1975 году (Aho, 1975). Суть его заключена в использовании структуры данных – бора и построения по нему конечного детерминированного автомата. Бор можно представить как дерево, каждая вершина которого обозначает какую-то строку. Между вершинами может быть написана только одна буква. Узлы дерева должны соответствовать префиксам исходной подстроки. А для того, чтобы проводить поиск и переходить по узлам бора, необходимы суффиксные ссылки, которые находятся на узле самого длинного суффикса и позволяют продолжать поиск. Путь от корня до любой вершины дерева соответствует какой-либо строке из набора. Пример построенного бора представлен на рисунке 7 для строк: AC, TAC, AGT, ACGT используя алгоритм Ахо-Корасик:

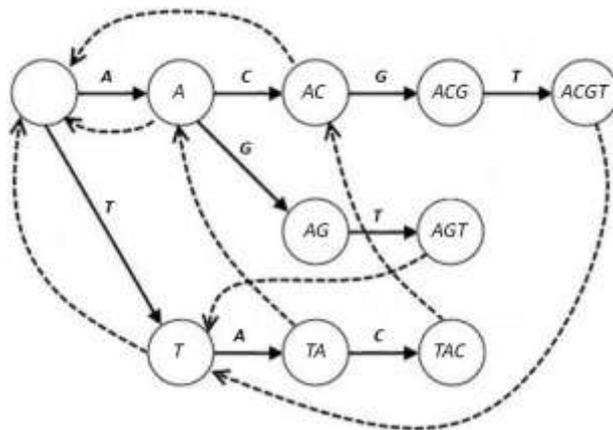


Рисунок 7 - Схематичное изображение автомата алгоритма Ахо-Корасик для набора строк {AC, TAC, AGT, ACGT}

Данный алгоритм позволяет искать сразу несколько вхождений, то есть несколько праймеров. Сложность алгоритма линейно зависит от объема входных данных и определяется как  $O(n+m+z)$ , где  $n$  – длина подстроки,  $m$  – длина строки,  $z$  – общее количество вхождений подстроки в строке ([https://e-maxx.ru/algo/aho\\_corasick](https://e-maxx.ru/algo/aho_corasick), 30.09.2023), [https://neerc.ifmo.ru/wiki/index.php?title=Алгоритм\\_Ахо-Корасик](https://neerc.ifmo.ru/wiki/index.php?title=Алгоритм_Ахо-Корасик), 10.11.2023).

Литературный обзор современного состояния дел в амплификации нуклеиновых кислот показывает рост интереса к изотермической LAMP-реакции, однако для ее успешного проведения необходимы качественные инструменты подбора специфичных праймеров.

Было выявлено, что практически во всех наиболее популярных программах дизайна LAMP-праймеров имеется ограничение на длину анализируемого участка, далеко не все подбирают петлевые праймеры, не исключают повторяющиеся, подряд идущие нуклеотиды в одном праймере, а так же не исключают образования димерных структур как в самом праймере, так и в сформированном наборе. Так же, проведя анализ математических алгоритмов поиска праймеров и учитывая особенности подбора LAMP-праймеров необходимо предложить иной, новый алгоритма прямого

перебора с использованием трафаретного подхода, учитывающий GC-состав и температуру отжига LAMP-праймеров.

Таким образом, подбор праймеров для LAMP представляет собой нетривиальную задачу и требует разработки специальной компьютерной программы с дружелюбным интерфейсом и многокритериальными условиями дизайна праймеров для LAMP. Для обеспечения более высокой чувствительности и достоверности обнаружения специфических ДНК и РНК особое внимание необходимо уделить именно образованию димерных структур и при этом желательно учитывать сближенное расположением мест отжига праймеров в одном наборе для выявления конкретных мишеней.

## ГЛАВА II. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### 2.1. Реактивы и материалы, использованные в работе

При выполнении работы использовались следующие реактивы и материалы:

- Реактивы: N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (TEMED), динатриевая соль N,N,N',N'-этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) (AppliChem); N,N'-метиленбисакриламид, Tween 20, бромид этидия, (все Sigma-Aldrich); маркер O'GeneRuler 10-300 (Thermo Fisher Scientific); бромфеноловый синий, ксиленцианол, трис, Triton X-100 (все Amresco); маркер длин Low molecular weight DNA (New England Biolabs); dsGreen (Люмипроб); дезоксинуклеозидтрифосфаты (СибЕнзим); уксусная кислота, этиловый спирт, персульфат аммония, маркер pUC19/MspI (все отечественного производства, фирм Хеликон, Диа-М, квалификации "ХЧ" или "для молекулярной биологии").

- Ферменты: ДНК-полимеразы Bst-Synta и Taq-Synta (обе SynGen); T4 полинуклеотидкиназа, T4 ДНК-лигаза (все Thermo Fisher Scientific); ДНК-полимераза Bst 3.0, ДНК-лигаза SplintR (New England Biolabs).

Для приготовления растворов использовали воду высшей категории качества (>18 МОм, Millipore).

### 2.2. Олигонуклеотиды, использованные в работе

Нуклеотидные последовательности использованных в работе олигонуклеотидов (ОДН) представлены в таблице 2. Праймеры подбирали на основе последовательностей ДНК, депонированных в Генбанке (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), и последовательностей миРНК, взятых из базы данных микроРНК (<https://www.mirbase.org>). ОДН были синтезированы под заказ (Синтол, Евроген, Люмипроб).

Таблица 2 – Олигонуклеотиды, использованные в работе.

№№	Название	Последовательность, 5'→3'	Длина, нт
1	F3 L	GAAGTCCCTGTTGCTATTCATGCAGAT	27
2	B3 L	TTGACTAGCTACACTACGTGCCC	23
3	FIP L	CCTATTAAACAGCCTGCACGTGTTTGTACTCCTACTTGGCGTGTTTATTCTAC	53
4	BIP L	CCGATGAGACTTAGTCTGAGTCTGATACTCATATGAGTGTGACATACCCATTG	53
5	F3 N	CAGAAGTCCCTGTTGCTAT	19
6	B3 N	CGATGAGACTTAGTCTGAGT	20
7	FIP N	TGCACGTGTTTGAAAAACATTAGAATCATGCAGATCAACTTACTCC	46
8	BIP N	GGCTGTTTAATAGGGGCTGAATATCTGATAACTAGCGCATATACCTG	47
9	F3 P	CAGAAGTCCCTGTTGCTAT	19
10	B3 P	GGATTGACTAGCTACACTACG	21
11	FIP P	GCCTGCACGTGTTTGAAAAACACATGCAGATCAACTTACTCC	42
12	BIP P	AATAGGGGCTGAATATGTCAACAACCTCTGAGTCTGATAACTAGCG	45
13	pvY eF	ATACGACATAGGAGAAACTGA	
14	pvY eR	ACGCTTCTGCAACATCTGAG	
15	pvY iF	GTTTGGCGAGGTTCCATTTTCTGTGATGAATGGGCTTATGGT	
16	pvY iR	TGAAACCAATCGTTGAGAATGATGTGCCATGATTTGCCTAAG	
17	Tae-miR-159	ugaagcugccagcaugaucugc*	
18	miT159	GGATTGAAGGGAGCTCTGACGACACCTCAGGCGATGCCAACCAACCAAGGAACCAAGAGGA ACTCCACGAGCGTCGCTAGGAGGAACCAACAGAGCTCCCTTCAATCC	
18	FIP 159	GTTCCCTTGGTTGGTTGGTTTCGACACCTCAGGCGATG	

20	BIP 159	AGAGGAACTCCACGAGCTTTTGGTTCCTCCTAGCGAC	
21	FIP 159ins	G TTCCTTGGTTGGTTGGT <b>G GACTCTCGGACT</b> CGACACCTCAGGCGATG**	
22	BIP 159ins	AGAGGAACTCCACGAGCTT <b>AGCACCTCGGT</b> GATTGGTTCCTCCTAGCGAC**	
23	HS-miR-16	uagcagcacguaaauauuggcg*	
24	miT16	CAGCACGTAAATATTGGCGATTACCAGCTCAGGCTCCTTCTGGACCGGTCACAGACAGGCAT ACGACCACCACCTTTGCAAGCGAGAGTGCGAAGCCGCCAATATTTACGTGCTG	
25	FIP-16	TGTCTGTGACCGGTCCAGTTTTTACCAGCTACGGCTCCT	
26	BIP-16	GCATACGGACACCACCTTTTTCTTCGCACTCTCGCTTGC	
27	FIP 16ins	TGTCTGTGACCGGTCCAGTT <b>AGCACCTCGGT</b> GATTACCAGCTACGGCTCCT**	
28	BIP 16ins	GCATACGGACACCACCTT <b>G GACTCTCGGACT</b> TTTCTTCGCACTCTCGCTTGC**	
29	HP L	GTCACCACCCCTGGAGACTACTAATTGTCCGTTACCGTTCCCGTCTCCAGGGGTGGTGAC	
30	HP R	GCGGCTCGCTGATCAAGAAGCGGCTCGCTGATCAAGAAGCTTCTTGATCAGCGAGCCGC	
31	FIP L2	GTCACCACCCCTGGAGACCCATTGCCTGTTAATCAT	
32	BIP R2	GCGGCTCGCTGATCAAGAAGCGAAGCAAGATTGCAAGA	
33	pV eF	TGCGGATGGCATAACGACATAG	
34	pV eR	CATATCGTGGCATATATGGTTCCTT	
35	pV iF	TCCGTTGACATTTGGCGAGGTTCCATTGAATGGAGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGG	
36	pV iR1	GGTTATGATGGATGGGAATGAACCTGAACTCCGATTGGTTTCAACGGGTACT	
37	pV iR2	CCCTTAGGCAAATCATGGCACACTCGCTTATACGCTTCTGCAACATCTGAG	

\* строчными буквами выделены рибонуклеотиды.

\*\* жирным шрифтом выделены нуклеотиды GC-"замка".

LAMP-праймеры конструировали с использованием сторонних программ: NEB LAMP Primer Design (<https://lamp.neb.com/#!/>) и Primer Explorer 5 (<https://primerexplorer.jp/e/>), а также с помощью собственных программ: LAMPprimers iQ, LigLAMP, mirLAMP и MIP-LAMP.

### **2.3. Моделирование LAMP-реакции и программы подбора LAMP-праймеров**

Анализ протекания LAMP-реакции и установление типов лампликонов с учетом их размеров и номенклатуры праймерных зон проводился вручную и с помощью специально разработанных безымянных компьютерных программ.

Специализированные компьютерные программы дизайна LAMP праймеров были написаны на основе собственного трафаретного алгоритма с помощью высокоуровневого языка программирования Python, компилируемого статически типизированного языка программирования общего назначения C++, библиотеки biopython. Программы заточены под конкретные задачи, но сохраняют возможность более гибкого использования, и могут использоваться для работы с нестандартными наборами праймеров или широким спектром параметров дизайна. Реализация алгоритма, согласно которому осуществляются основные вычисления в программах, имеет модульный характер и каждая программа может быть использована как составляющая более крупного программного комплекса в дальнейшем. Интерфейс программ LAMPprimers\_iQ, LAMPprimers iQ-loop был разработан с помощью framework Qt. Оценка функционала программ проводилась на ПК со следующими характеристиками: процессор Intel(R) Core(TM) i7-10750H CPU, 2.60GHz, 6 ядер. 16 ГБ ОЗУ.

## 2.4. Молекулярно-биологические методы исследований

### 2.4.1. Объекты исследования

Биологическими объектами в данном исследовании выступили образцы РНК коронавируса SARS-CoV-2, любезно предоставленные д.м.н. А.Р.Мавзютовым (БГМУ), образец кДНК картофельного РНК-вируса Y (pvY), любезно предоставленная к.б.н. Е.В. Михайловой (ИБГ УФИЦ РАН), образец микроРНК пшеницы Taе-miR-159, любезно предоставленный к.б.н. Г.Ф. Бурхановой (ИБГ УФИЦ РАН), а также синтетическая микроРНК человека HS-miR-16.

Генетический материал коронавируса SARS-CoV-2 был представлен лизатами назофарингеальных мазков, взятых у больных COVID-19 (N=20) с использованием набора для выделения М-Сорб-ООМ-96 (Синтол). Выделение РНК SARS-CoV-2 осуществлялось в ООО "ИЦ "Лаборатория" сотрудниками, имеющими допуск к работе с патогенами. Диагноз COVID-19 был подтвержден ими методом ОТ-ПЦР с использованием набора для детекции ОТ-ПЦР-SARS-CoV-2 (Синтол). Также использовались экстракты мазков из носоглотки с сомнительными (N=10) или отрицательными (N=10) результатами ПЦР на SARS-CoV-2.

МиРНК выделяли из растений мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) по следующей методике. Проростки пшеницы выращивали в 10% растворе Хоугланда-Арнона в климатоканере КС-200 СПУ (Россия) при температуре 20/24°C (ночь/день) с 16-часовым фото периодом. Через 6 дней выделяли миРНК из 100 мг тканей листа с помощью набора для выделения миРНК (Биолабмикс).

### 2.4.2. Лигирование НР-проб

Предварительно проводили фосфорилирование олигонуклеотидов НР L и НР R с помощью полинуклеотидкиназы T4 в соответствии со стандартным протоколом. Фосфорилированные НР L и НР R лигировали на

моддерживающей матрице, в качестве которой выступала миРНК, в 10 мкл реакционной смеси, содержащей  $10^9$  копий миРНК,  $5 \cdot 10^{10}$  копий HP L и HP R, 5 ед. акт. T4 ДНК-лигазы или лигазы SplintR, 1× буфер лигазы. Реакционные смеси инкубировали 18 ч при комнатной температуре с последующей инактивацией лигазы при 75°C в течение 20 мин. Полученные продукты лигирования использовали далее для проведения LAMP без дополнительной очистки.

#### *2.4.3. Петлевая изотермическая амплификация*

Амплификацию нуклеиновых кислот с детекцией в реальном времени проводили в ДНК-термоциклере CFX96 Opus (Bio-Rad Laboratories). Образцы для амплификации готовили в ПЦР-боксе UVC/T-M-AR (Biosan), обрабатывая рабочее пространство, автоматические дозаторы и пластиковую посуду ультрафиолетовым светом в течение 20 мин. Каждый образец готовился в двух или трех повторностях. Образцы для отрицательных контролей готовили аналогично, и они содержали все остальные компоненты соответствующих реакционных смесей, кроме анализируемых НК.

LAMP-амплификацию проводили в реакционной смеси объемом 10-20 мкл, содержащей 1-2 мкл 10× буфера ДНК-полимеразы Bst-Synta или Bst 3.0, 1-2 мкл 2,5 мМ смеси дНТФ, 3,0 ед. акт. ДНК-полимеразы Bst-Synta или Bst 3.0, 1,6 мкМ праймеров FIP и VIP (внутренние), 0,2 мкМ праймеров F3 и B3 (внешние), 0,5× интеркалирующего красителя dsGreen. Анализируемые образцы содержали 1 мкл образцов ДНК или РНК.

#### *2.4.4. Гель-электрофорез*

Электрофорез препаратов продуктов амплификации проводили с использованием 10-15%-ных полиакриламидных гелей в камере вертикального типа Mini-Protean (Bio-Rad Laboratories) при напряжении 90-110 В. Источником питания служил прибор "Эльф-4" (ДНК-технология). В качестве буферной системы использовали TAE-буфер. Для нанесения

препаратов ДНК в гель использовался водный раствор, содержащий 0,25% бромфенола синего, 0,25% ксиленцианола и 30% глицерина. Для определения размера фрагментов ДНК использовали ДНК-маркеры O'GeneRuler 10-300 п.о. (TFS) и pUC19/MspI (СибЭнзим). После окончания электрофореза гели окрашивали бромистым этидием (5 мкг/мл) в течение 10 мин. Флуоресценцию регистрировали при помощи системы GelDoc XP (Bio-Rad Laboratories).

#### *2.4.5. Нанопоровое секвенирование лампиконов*

Для анализа лампиконов разного размера с целью установления чередования праймерных зон в них было проведено заказное нанопоровое секвенирование лампиконов в приборе MinION (Oxford Nanopore Technologies).

### ГЛАВА III. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Петлевая изотермическая амплификация (LAMP) является достойной альтернативой ПЦР. В оригинальной статье (Notomi et al., 2000) для проведения LAMP-реакции было предложено использовать два внешних праймера F3 (Forward) и B3 (Backward), а также два внутренних праймера FIP (Forward Inner Primer) и BIP (Backward Inner Primer). FIP и BIP содержат по паре мест отжига на мишени: F1c|F2 и B1c|B2, соответственно (рисунок 8).

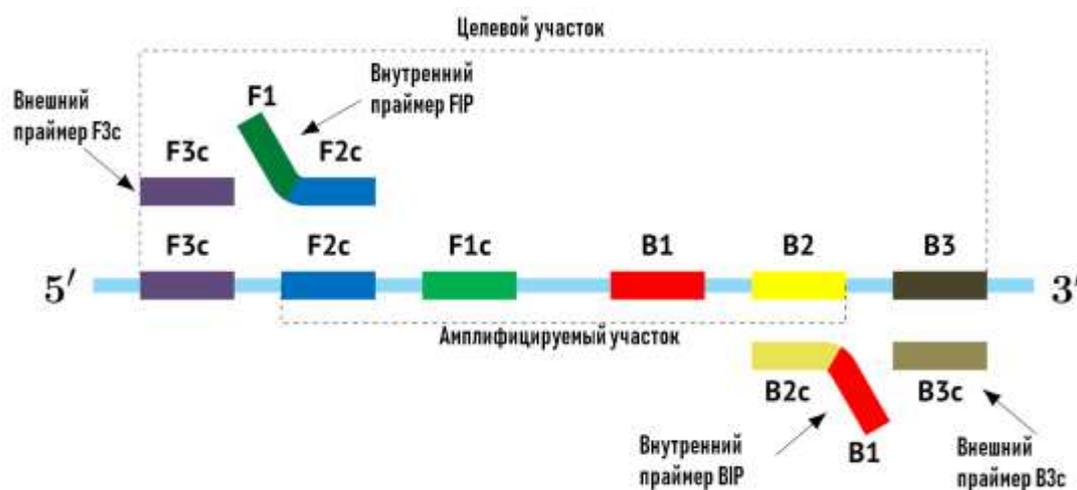


Рисунок 8 - Стандартная схема расположения зон отжига праймеров в LAMP и их обозначение согласно (Notomi et al., 2000)

Чуть позже для ускорения реакции была предложена модификация метода, предполагающая использование уже 6 праймеров, специфичных к 8 участкам мишени (Nagamine et al., 2002). Были добавлены еще два петлевых праймера Loop Primer F и Loop Primer B, которые отжигаются на участках мишени между зонами F2c и F1c, а также между B1 и B2 соответственно. Затем другие авторы предложили вариант LAMP с т.н. stem-праймерами, места отжига которых располагались между F1c и B1 (Gandelman et al., 2011). Из-за увеличенного числа праймеров и их особого устройства даже

стандартная LAMP-реакция протекает гораздо сложнее, чем классическая ПЦР. Подтверждением этому также служат результаты гель-электрофореза продуктов этой реакции в виде характерной лесенки полос ДНК увеличивающегося размера в сравнении с обычной ПЦР (рисунок 9).

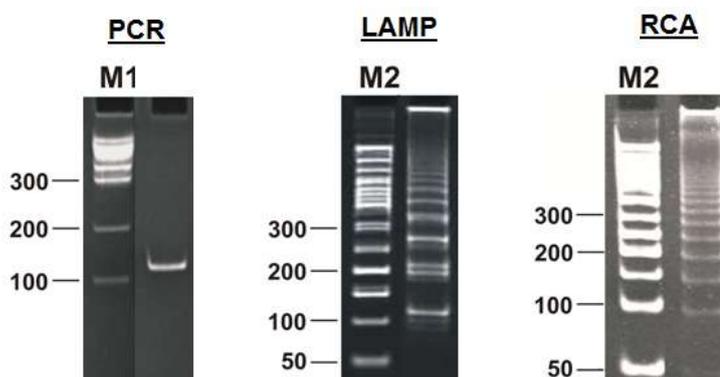


Рисунок 9 - Продукты разных реакций амплификации. А. Ампликоны в ПЦР; Б. Лампликоны в LAMP; В. Конкатемеры в двухпраймерной RCA. M1 и M2 – стандартные маркерные лестницы

В связи с принципиальными отличиями между ампликонами в ПЦР и продуктами наработки в ходе LAMP, разными авторами было предложено для последних ввести название «лампликон» (Yang et al., 2012; 2013; Ahsan et al., 2017; Bektaş, 2017), которым мы здесь будем пользоваться.

Несмотря на прошедшую со времени изобретения метода LAMP четверть века (Notomi, Hase, 1999) и множество выполненных работ с применением LAMP-реакции, имеются лишь единичные работы, описывающие возможные типы лампликонов и их состав (Subramanian, Gomez, 2014; Gordon et al., 2019; Kaur et al., 2020). Это не удивительно, поскольку структура лампликонов крайне сложна и их разнообразие не поддается простому описанию. Первым препятствием служит принятая еще в 2000 г. номенклатура зон в мишени, на которых отжигаются группы праймеров, приведенная на рисунке 8.

### 3.1. Новая номенклатура продуктов LAMP

Чтобы было удобнее разбираться в структуре образующихся лампликонов, необходимо использовать упрощенные обозначения зон отжига праймеров. Так, чтобы уйти от приведенных на рисунке 8 обозначений, нами предлагается использовать с учетом важности зон согласно латинского алфавита такие однобуквенные обозначения: вместо зон F3c, F2c, F1c, B1, B2, B3 – буквы F, A, B, C, D, E, а для комплементарной цепи – f, a, b, c, d, e, соответственно. Зоны отжига петлевых праймеров LF и LB можно обозначить как X, Y и x, y, соответственно. В целом все эти зоны можно обозначить как Z и z (zone), сопроводив цифрами, соответствующими числу таких зон в конкретном лампликоне. Используемые в LAMP-реакции праймеры будут нести следующие буквенные обозначения: внешний праймер F3c будет ‘F’, внешний праймер B3 будет ‘e’, внутренние (составные) праймеры FIP и VIP будут обозначены двумя буквами – bA (5’-bA-3’) и Cd (5’-Cd-3’). Петлевые праймеры LF и LBc будут ‘X’ и ‘y’ соответственно. Далее, где не будут указываться направления последовательности зон (в том числе для праймеров), они по умолчанию будут приводиться как 5’→3’.

#### 3.1.1. Этапы преамплификационной фазы классической LAMP-реакции

Рассмотрим протекание LAMP-реакции и структуру продуктов, рисунок 9. Все зоны на исходной цепи, служащей мишенью T1 или матрицами T2, T3, T4 для отжига праймеров в LAMP-реакции без участия петлевых праймеров, могут быть записаны как 5’-...FABCDE...-3’, где многоточия символизируют фланкирующие последовательности неопределенной длины. При проведении LAMP-реакции с петлевыми праймерами (в целом данный вариант останется за пределами рассмотрения) зоны в мишени T1 могут обозначаться как 5’-...FAXBCYDE...-3’ (рисунок 10).

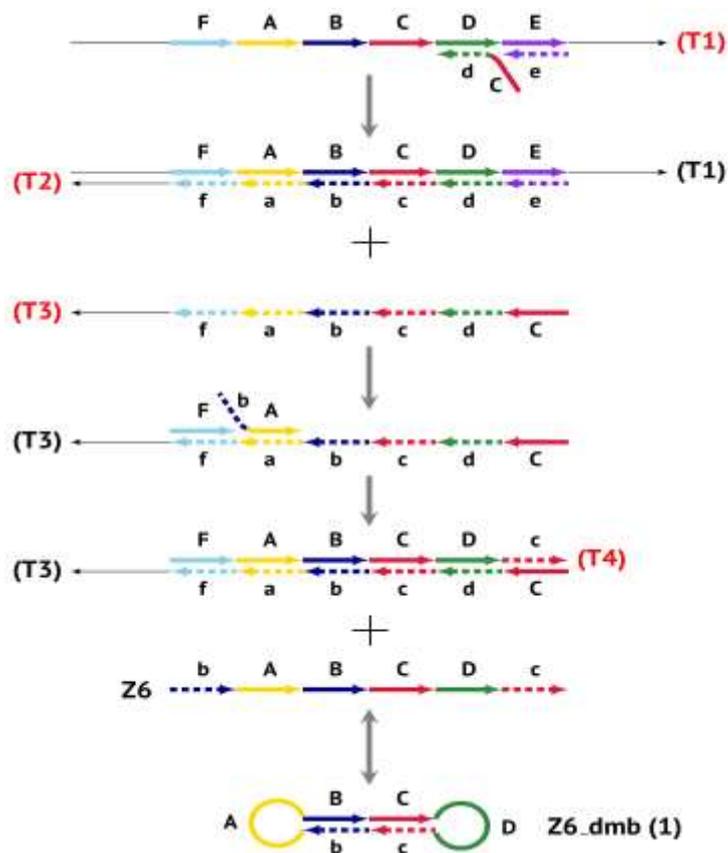


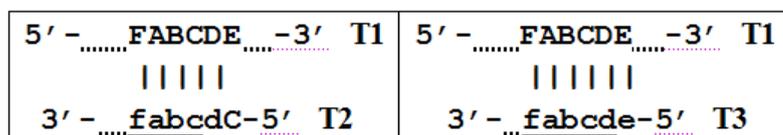
Рисунок 10 - Начальные этапы LAMP-реакции

Необходимо отметить, что каждая из описываемых ниже структур может возникать с определенной вероятностью, которая зависит от конкуренции между отжигом праймеров и самопраймированием, что в свою очередь определяется нуклеотидным составом последовательностей различных зон мишени. В связи с тем, что они для разных мишеней могут сильно различаться, здесь придется рассматривать все возможные варианты образования шпилечных структур и зон отжига как для праймеров, так и для 3'-концов лампиконов, обеспечивающих самопраймирование.

Главным условием протекания LAMP-реакции является опережающий отжиг на начальных этапах преамплификационной фазы внутренних праймеров, чтобы построенные с них цепи были затем смещены и оказались одноцепочечными. В этом случае они становятся пригодны для отжига на них новых праймеров. Это происходит благодаря запоздалому удлинению

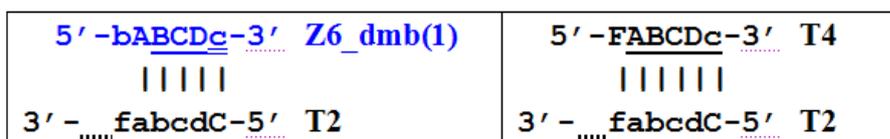
внешних праймеров, что достигается присутствием последних в более низкой концентрации в реакционной смеси.

На рисунке 10 приведены начальные этапы LAMP-реакции, которые можно считать преамплификационной фазой. Более компактно изображенные на указанном рисунке процессы можно отобразить с помощью однобуквенных символов. Подобная запись демонстрирует, что несмотря на одинаковые размеры, различные лампликоны имеют отличающиеся составы зон, что особенно будет заметно при переходе данной реакции к фазе экспоненциального размножения. Так, при отжиге на мишени T1 (5'-FABCDE-3') последовательно праймеров 'Cd' и 'e' возникнут следующие структуры:



где вертикальные линии символизируют водородные связи между комплементарными условными нуклеотидами в конкретных зонах, а подчеркиванием обозначены строящиеся новые цепи с праймера, который сам остается неподчеркнутым. Аналогично не подчеркивается зона, послужившая для самопраймирования. В дальнейшем такие цепи вкупе с праймером, являясь единым целым, служат уже новыми матрицами, и приводятся без подчеркивания. Буквенно-цифровые обозначения указывают на тип цепи ДНК, строящейся с отжигшегося праймера. При этом схожая кодировка будет использоваться и при описании процессов, происходящих в экспоненциальной фазе LAMP-реакции, включая основной LAMP-цикл, а также phn-LAMP-реакцию.

Поскольку при построении цепи T3 при элонгации внешнего праймера 'e' цепь T2 будет смещена, то она становится одноцепочечной и пригодной для отжига на ней праймеров 'bA' и 'F'. При элонгации праймера 'bA' сформируется структура **aBCDc Z6\_dmb(1)**, где двойным подчеркиванием обозначена зона, обеспечивающая самопраймирование.

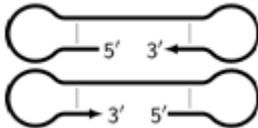
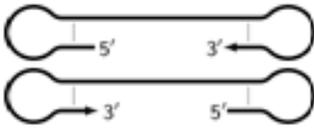
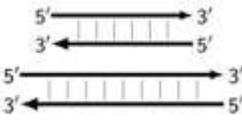


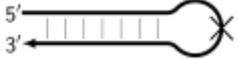
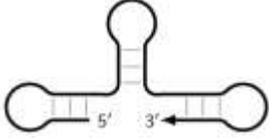
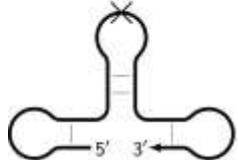
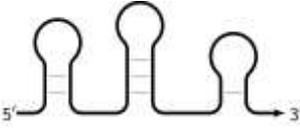
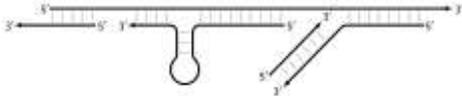
Удлиняясь, праймер ‘F’ приведет к смещению цепи Z6\_dmb(1), являющейся первой гантелеподобной структурой. Образование Z6\_dmb(1) является самым важным результатом преамплификационной фазы LAMP-реакции.

### 3.1.2. Типы продуктов в LAMP-реакции

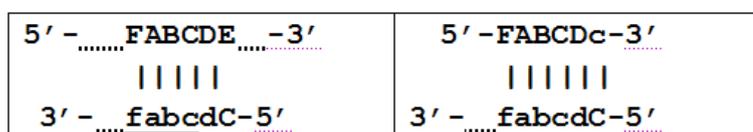
Образовавшаяся в ходе преамплификационной фазы структура 5'-**bABCDC**-3' Z6\_dmb(1) запускает каскад последующих событий и является одним из основных элементов реакции. Но прежде чем перейти к детальному рассмотрению процессов, происходящих в LAMP-цикле и за его пределами, следует остановиться на различных типах лампиконов. Отметим, что ранее Kaur и соавт. (Kaur et al., 2020) выделили среди продуктов LAMP-реакции четыре типа продуктов: SL (single loop), T (terminated), SS (single-stranded) и PDS (partially double-stranded), сопроводив некоторые из них римскими цифрами – I, II и III. Другие авторы, анализируя вторую фазу LAMP-реакции, начиная с гантелеподобных структур, назвали ее IDEA (isothermal dumbbell exponential amplification), используя несколько отличающиеся стартовые структуры, которые были обозначены как Short Dumbbell, Middle Dumbbell, Long Dumbbell (Savonnet et al., 2022). В результате самопраймирования Initial Dumbbell образуется Hairpin B2c = Hp1b. Через несколько смещений разных цепей возникает симметричная ей шпилька, которая была названа ими как Hairpin 1 F2c = Hp1f. Однако в ходе LAMP-реакции возникают и некоторые другие типы лампиконов (таблица 3), которым также нужно уделить внимание.

Таблица 3 - Типы продуктов в классической LAMP.

Рисунок	Название	Краткое описание
<b>Промежуточные продукты реакции LAMP</b>		
	<p>Z_dmb(1)</p> <p>Z_dmb(2)</p>	<p>Структуры в виде одно-/двухцепочечной ДНК, напоминающие гантель (dumbbell). Буква Z (zone) сопровождается численным значением, соответствующим количеству зон в конкретных продуктах. Z6_dmb(1) и Z6_dmb(2) - основные типы лампликонов, запускающие каскады построения цепей ДНК и обеспечивающие экспоненциальное размножение.</p>
	<p>Z9_dmb(1)</p> <p>Z9_dmb(2)</p>	<p>Удлиненные dmb структуры в виде одно-/двухцепочечной ДНК, аналогичные Z6_dmb, но отличающиеся длиной межпетлевых участков за счет разного числа зон.</p>
	Z_hr	<p>Структура в виде одноцепочечной ДНК (петля) и двухцепочечной ДНК (стержень), напоминающая шпильку. Возникает из Z_dmb.</p>
	Z_li	<p>Одно-/двухцепочечная структура ДНК (linear), возникающая при линейризации шпильчатой структуры Z_hr и превращающаяся затем в новую структуру Z_hr большего размера и при этом генерирующая структуры Z_dmb меньшего(их) размера(ов).</p>
<b>Тупиковые (Stop) лампликоны в реакции LAMP</b>		
	ZzS	<p>Полностью двухцепочечная структура ДНК (например Zz9S), порождаемая достройкой полимеразой какой-либо структуры типа Z_li или Z_dmb (в данном случае Z9_li или Z9_dmb) и неспособная к дальнейшему размножению.</p>

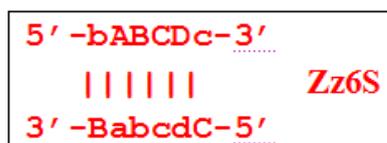
	Z_hpS	Структура, напоминающая шпильку (hairpin) в виде двухцепочечной ДНК (стержень) и одноцепочечной ДНК (петля), на которой (петле) не может отжечься очередной праймер, что отмечено перечеркиванием петли.
Другие нестабильные продукты LAMP-реакции		
	Z_dmb_hp	Гантелеподобная структура с выпетливанием в стержневой части, на петле которой также способен отжечься один из внутренних праймеров с последующей элонгацией и смещением цепей.
	Z_dmb_hp	Гантелеподобная структура с выпетливанием в стержневой части, на петле которой не способны отжечься внутренние праймеры, что символизирует перечеркивание петли
	Z_mtlp	Возникающая на поздних стадиях одно-/двухцепочечная ДНК, содержащая множественные различные выпетливания (multiple loops), также способная принимать участие в дальнейшей амплификации
	cauliflower-like	Возникающая на поздних стадиях высокомолекулярная одно-/двухцепочечная ДНК, несущая отжегшиеся друг на друге цепи в хаотичном порядке. Ограниченно годна для дальнейшей амплификации.

Вероятность образования тех или иных типов продуктов зависит от их локальной первичной структуры и не может быть предсказана с высокой точностью. Также нужно отметить, что в вариантах LAMP-реакции с Loop-праймерами и Stem-праймерами, а также в методе DAMP (Ding et al., 2019), возникают еще иные типы продуктов в виде "полу-гантелей" (semi-dumbbell, sdmb), но здесь касаться их не будем. Среди конечных продуктов LAMP-реакции будут также молекулы ДНК с двуцепочечными участками, в целом соответствующими мишени и фланкирующими одноцепочечными участками неопределенной длины:



Число таких молекул приблизительно будет соответствовать изначальному числу копий искомой последовательности и серьезного вклада в общее количество ДНК-продуктов они вносить не будут.

После появления в реакционной смеси первой структуры **bABCDc** (обозначена как Z6\_dmb(1)) начинается экспоненциальная амплификация в виде LAMP-цикла, продолжающаяся за счет выхода ряда продуктов во внешний контур NGEL (Next Generation of Extended Lamplicons), а также образуются аналогичные структуры. Происходящие процессы представлены на рисунке 11. При этом наибольший интерес представляет LAMP-цикл, который повторяется многократно и возникает на следующих этапах при образовании лампликонов большего размера в ходе NGEL при их возврате к основному лампликону Z6\_dmb (рисунок 12). При вхождении в LAMP-цикл цепь **bABCDc** оказывается пригодной для отжига праймера 'Cd', что приводит к тупиковому лампликону Zz6S, количество которого будет расти:



При этом *Zz6S* и ему подобные тупиковые двуцепочечные лампликоны визуализируются при гель-электрофоретическом разделении продуктов LAMP.

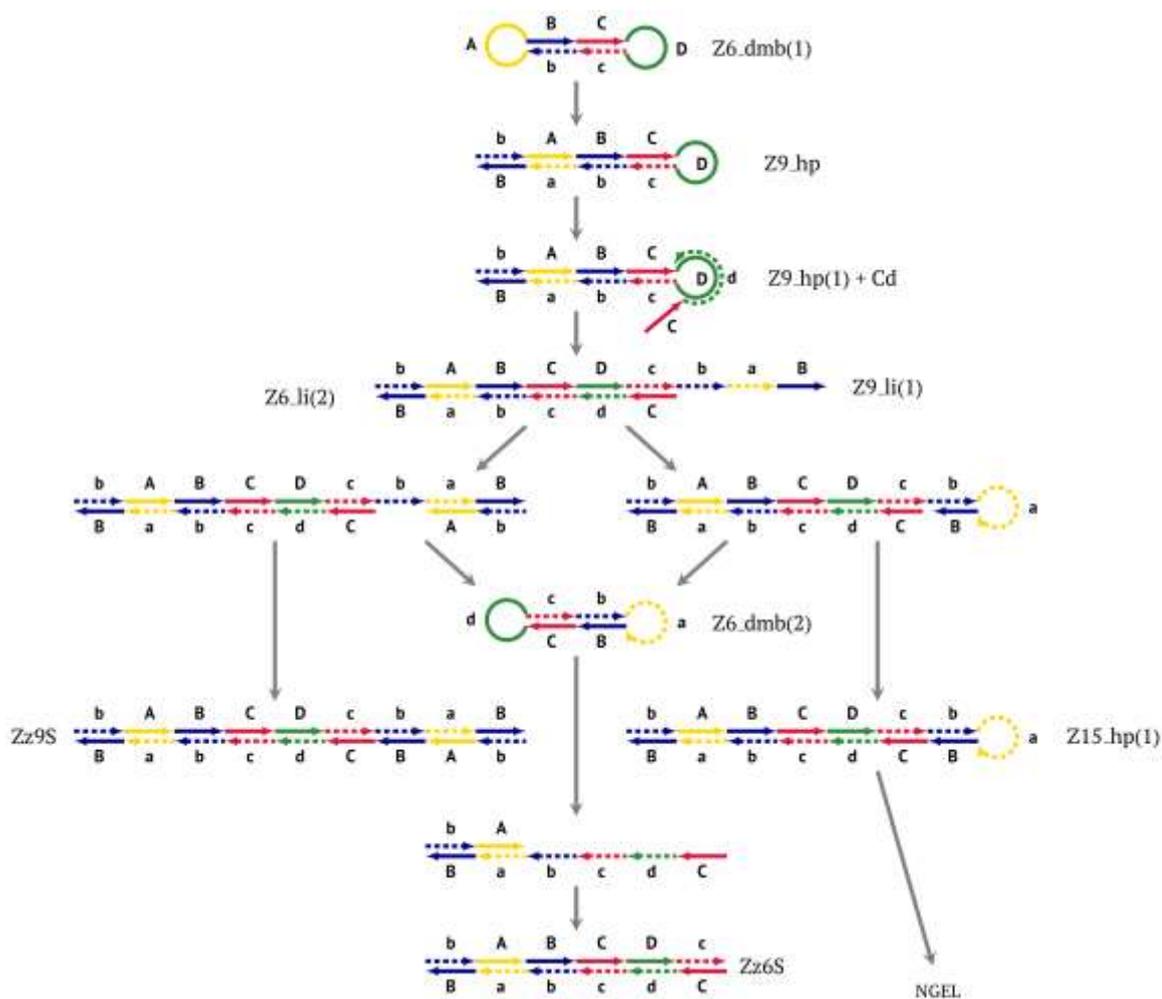


Рисунок 11 - Схема протекания первого этапа экспоненциальной фазы LAMP

Вероятность образования лампликона *Zz6S* довольно высока с учетом того, что праймер *Cd* будет отжигаться на матрице *bABCDc* сразу на двух зонах (выделенных здесь курсивом), составляя серьезную конкуренцию самопраймированию, в котором задействована одна зона.

Структура *bABCDc* за счет самопраймирования (отжига зоны 'c' на зоне 'C') и последующего удлинения цепи приводит к формированию новой шпилечной структуры *Z9\_hp\_D*, где *hp* – hairpin, с петлей в виде зоны 'D':

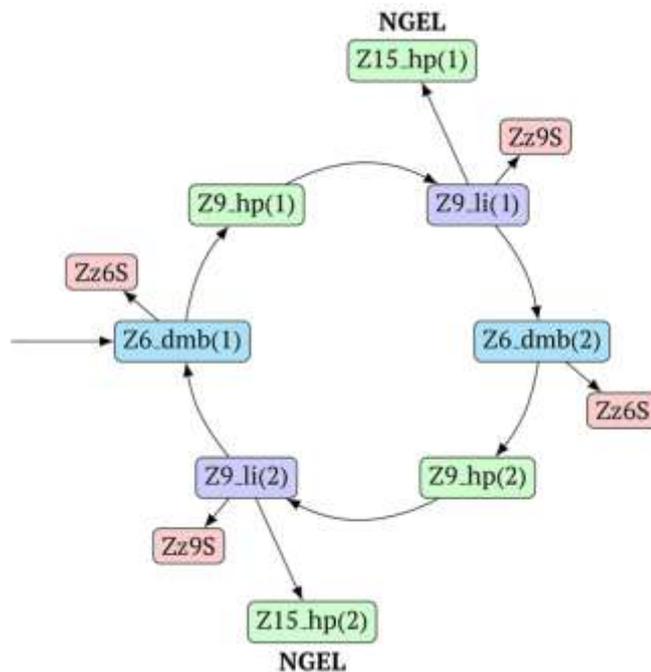
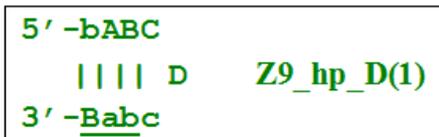
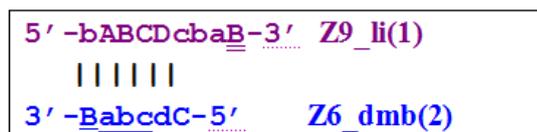
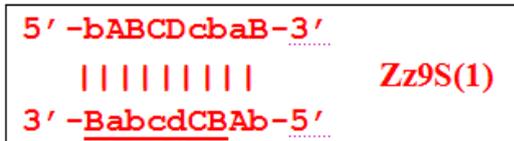


Рисунок 12 - Основной (первый) LAMP-цикл экспоненциальной фазы в классическом варианте LAMP изотермической петлевой амплификации, начинающийся с вхождения в циклический процесс структуры Z6\_dmb(1), образовавшейся во время фазы преамплификации. Во внешний контур, где имеет место NGEL, выходят лампликоны Z15\_hp

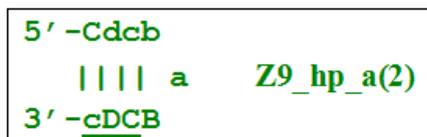
На образующейся одноцепочечной петле, формируемой зоной 'D', способен отжечься праймер 'Cd' зоной 'd', удлинение которого полимеразой вызовет смещение цепи, встретившейся ей на пути, и превратит Z9\_hp\_D в ее линейаризованный вариант – Z9\_li(1), у которого будет иметься двуцепочечный участок, несущий цепь Z6\_dmb(2):



На цепи Z9\_li(1) способен отжечься также праймер 'bA' (двумя зонами), что приведет как к тупиковому лампликону:



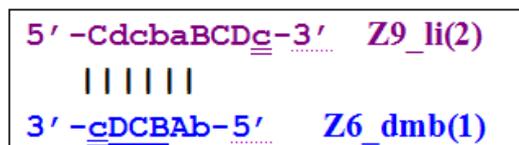
так и к смещению цепи **CdcbaB**, формирующей вторую гантелеподобную структуру Z6\_dmb(2) с последовательностью, комплементарной Z6\_dmb(1). Под действием полимеразы Z6\_dmb(2) удлиняется с образованием новой шпильки с петлей в виде зоны 'а':



Отжиг на петле 'а' цепи Z9\_hp\_a(2) праймера 'bA' (поначалу одной зоной 'A') и его элонгация приведет в дальнейшем к возможности отжига праймера 'Cd' (двумя зонами) и формированию ряда структур, среди которых будет тупиковый лампикон Zz9S(2), имеющий последовательность, отличную от последовательности Zz9S(1):



Вытесненная полимеразой в результате удлинения праймера 'Cd' цепь **bABCDc**, построенная с праймера 'bA', повторит структуру первого базового лампикона Z6\_dmb(1), который запустит новый цикл:



Таким образом, в рамках одного LAMP-цикла в классическом варианте данной реакции сформируется шесть промежуточных продуктов и четыре тупиковых лампикона, а также во внешний контур выйдут две удлиненные шпильчатые структуры Z15\_hp, из которых дальше будут возникать прочие структуры как больших, так и меньших размеров. Здесь можно заметить, что как в рамках LAMP-цикла, так и при последующих процессах размножения зонами самопраймирования выступают только 'c' и 'B'. Это необходимо

учитывать при дизайне праймерных систем, обращая особое внимание на 5'-концы праймеров FIP ('bA') и VIP ('Cd'), поскольку 3'-концы их комплементарных цепей будут удлиняться полимеразой при самопраймировании.

Две разные цепи Z15\_hp, выйдя за пределы LAMP-цикла, приведут к дальнейшему росту цепей ДНК и сформируют новые самоудлиняющиеся шпильчатые структуры. Протекание вышеописанных процессов синтеза новых цепей ДНК приведет к образованию продуктов, появление которых можно отобразить следующей схемой:

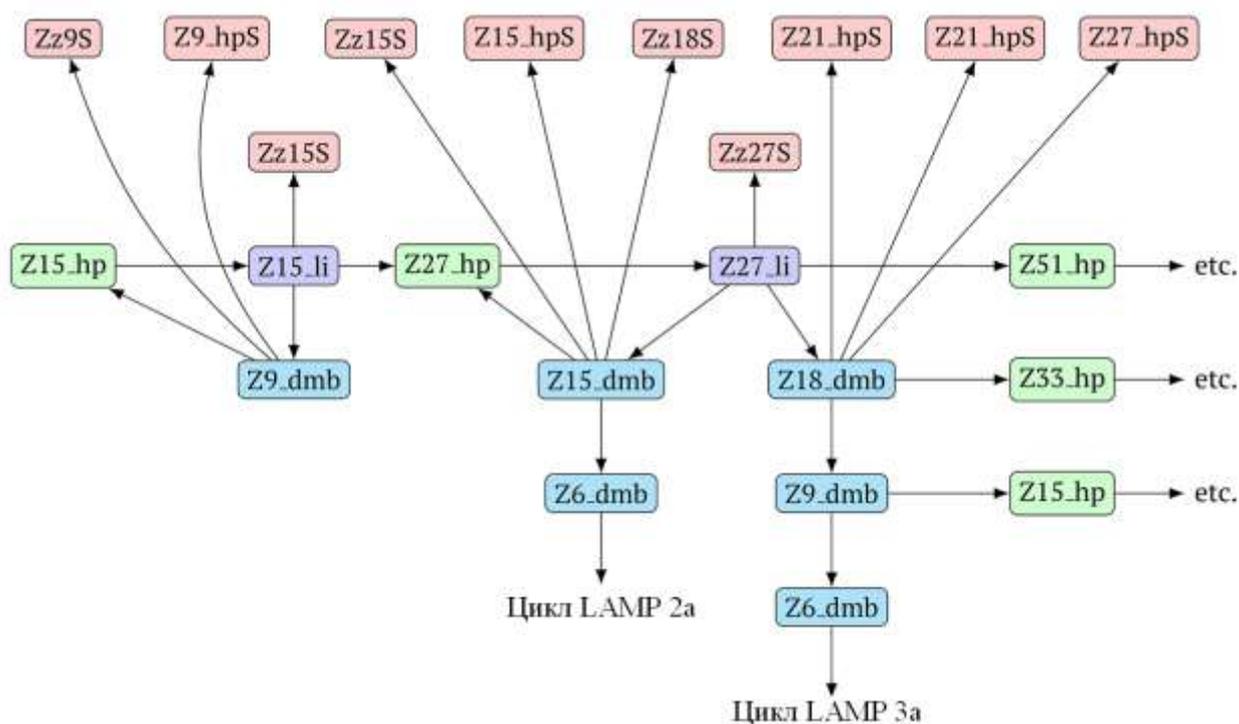


Рисунок 13 - Схема протекания LAMP-реакции за пределами LAMP-цикла после выхода во внешний контур лампликона Z15\_hp

Как можно видеть из схемы на рисунке 13, после образования лампликона Z27\_li и смещения цепей Z15\_dmb и Z18\_dmb образуются две новых основных гантелеподобных структуры Z6\_dmb, которые запустят новые LAMP-циклы, а с учетом того, что реакции симметричны, на схеме они получили обозначения 2а и 3а, подразумевая, что на этом этапе экспоненциальной NGEL фазы будут еще LAMP-циклы 2b и 3b.

Что касается роста цепей в ходе LAMP-реакции, то за счет самопраймирования увеличение количества зон в лампليконах подчиняется формуле:

$$Z_i = 2Z_{i-1} - 3.$$

Таким образом, основная линия генерации лампليконов в сторону их удлинения выглядит следующим образом:  $Z_6 \rightarrow Z_9 \rightarrow Z_{15} \rightarrow Z_{27} \rightarrow Z_{51} \rightarrow Z_{99}$  и т.д. Для другой линии выстроится следующий ряд:  $Z_{18} \rightarrow Z_{33} \rightarrow Z_{63} \rightarrow Z_{123}$  и т.д. Помимо них за счет того, что в лампليконах увеличенного размера, в том числе на смещаемых цепях, оказывается очень много мест для отжига праймеров, могут образовываться разнообразные вовлекаемые в дальнейший процесс размножения лампликоны, длины которых также кратны трем. Тупиковые лампликоны также будут иметь в своем составе количество зон, кратное трем. Однако нужно иметь в виду, что далеко не все возможные лампликоны будут нарабатываться в ощутимых количествах и будут ли вообще нарабатываться, что зависит от особенностей нуклеотидных последовательностей тех или иных зон в выбранной мишени.

В целом в ходе LAMP-реакции в ее экспоненциальной фазе в основном размерном ряду происходят следующие циклические процессы:

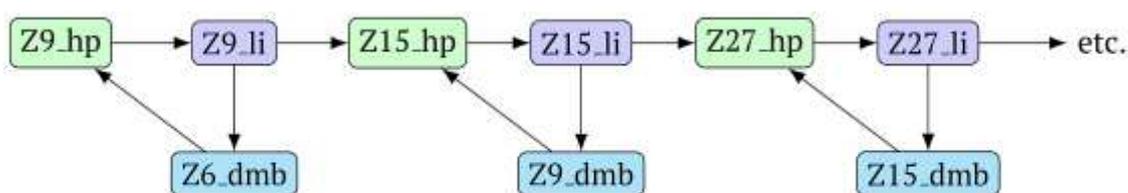


Рисунок 14- «Круговорот» лампликонов в LAMP-реакции

Для каждого типа лампликонов ( $Z_{dmb}$ ,  $Z_{hp}$ ,  $Z_{li}$ ) состав зон будет меняться, но их количество в рамках конкретных размерных границ будет неизменным. Как можно видеть из рисунков 13 и 14, лампликоны  $Z_{dmb}$ ,  $Z_{hp}$  и  $Z_{li}$  превращаются друг в друга, порождая лампликоны иных типов. Кроме того, в ходе экспоненциальной фазы LAMP вплоть до ее выхода на плато могут образовываться и другие варианты лампликонов с



5' - TTATTTATTGGTTCAGTTATGAAATACGGTGCTTAAACCGTTGAATGAGCCTACTGGGTCCCTCGTTTTCCGTAATTTATCGTGAAACGCTTTCGCGTTTTTCGTGCGCCGCTTCAGA  
TGGTGATGAACAAGTCGAATATCCGTTGAAACCAATCGTTGGAATGCAAAACCAACCCTGAAACCAATCGTTGGAATGCAAAACCAACCCTGAAACCAATCGTTGGAATGCAAAACCAACC  
CATCATCTCAACGATTGGTTTCAACGGATATTCGACTTGT  
CATCACCATCCATCATAACCCAGACTCCGTTGATGTTGGCGAGGTTCCATTTTCTGTGATGAATGGGCTTATGGTTGGTGCATTGAAATGGAACCTCGCCAAAATCAAAAGACGG  
TCTGGGTTATGATGGATGGTGAACAAAGTCGAATATCCGTTGAAACCAATCGTTGAGAATGATGTCGCATGATTTGCCTAAGGGTGGTTTTGCATCTCAACGATTCGTCACCGG  
ATATTCGACTTGTTCATCACCATCCATCATAACCCAGACTCCGTTGATGTTGGCGAGGTTCCATTTTCAATGCACCAAACCATAGGCCATTTCATACAGAAATGGAACCTCGCCAA  
ACATCAACGGAGTCTGGGTTATGATGGATGGTGAACAAGTCGAATATCCGTTACGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAAACCAACCCTGAAACCAATCGTTGGAATGCAAAACCA  
ACGATGGTTTTCAACGGATATTCGACTTGTTCATCACCATCCATCATAACCCAGACTCCGTTGATGTTGGCGAGGTTCCATTTTCTGTGATGAATGGGCTTATGGTTGGTGCATTG  
AAAATGGAACCTCGCCAAAATCAACGGAGTCTGGGTTCCGATGGATGGTATGAACAAGTCGAATATCCGTTACGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAAACCAACCCTGAAACCAATCGTTGGAATGCAAAACCA  
GGTTTTGCATCTCAACGATTGGTTTTAAACGGATATTCGACTTGTTCATCACCATCCATCATAACCCAGACTCCGTTGATGTTGGCGAGGTTCCATTTTCAATGCACCAAACCAAT  
AAGCCCATTCATACAGAAATGGAACCTCGCCAAAATCAACGGAGTCTGGGTTATGATGGATGGTGAACAAGTCGAATATCCGTTGAAACCAATCGTTGGAATGCAAAACCA  
ACCCTGAAACCAATCGTTGGAATGCAAAACCAACCCTGAAACCAATCGTTGGAATGCAAAACCAACCCTGAAACCAATCGTTGGAATGCAAAACCAACCCTGAAACCAATCGTTGGAATGCAAAACCA  
TGTGATGAATGGGCTTATGGTTGGTGCATTGAAATGGAACCTCGCCAAAATCAACGGAGTCTGGGTTATGATGGATGGTGAACAAGTCGAATATCCGTTGAAACCAATCGTTGGAATGCAAAACCA  
AGATGATGTCGCATGATTTGCCTAAGGGTGGTTTTGCATCTCAACGATGGTTTCAACGGATATTCGACTTGTTCATCACCATCCATCATAACCCAGACTCCGTTGATGTTGGCG  
AGGTTCCATTTTCAATGCACCAAACCATAGGCCATTTCATACAGAAATGGAACCTCGCCAAAATCAACGGAGTCTGGGTTATGATGGATGGTGAACAAGTCGAATATCCGTT  
GAAACCAATCGTTGGAATGATGTCGCATGATTTGCCTAAGGGTGGTTTTGCATCTCAACGATTGGTTTCAACGGATATTCGACTTGTTCATCACCATCCATCATAACCCAGACTC  
CGTTGATGTTGGCGAGGTTCCATTTTCTGTGATGAATGGGCTGATGGTTGGTGCATTGAAATGGAACCTCGCCAAAATCAACGGAGTCTGGGTTATGATGGATGGTGAACA  
AGTCGAATATCCGTTGAAACCAATCGTTGGAATGCAAAACCAACCCTGAAACCAATCGTTGGAATGCAAAACCAACCCTGAAACCAATCGTTGGAATGCAAAACCAACCCTGAAACCAATCGTTGGAATGCAAAACCA  
TCATAACCCAGACTCCGTTGATGTTGGCGAGGTTCCATTTTCAATGCGCCGAAACCATAGGCCATTTCATACAGAAATGGAACCTCGCCAAAATCAACGGAGTCTGGGTTATGAT  
GGATGGTGAACAAGTCGAATATCCGTTGAAACCAATCGTTGGAATGCAAAACCAACCCTGAAACCAATCGTTGGAATGCAAAACCAACCCTGAAACCAATCGTTGGAATGCAAAACCAACCCTGAAACCAATCGTTGGAATGCAAAACCA  
GTTCCATCACCATCATAACCCAGACTCCGTTGATGTTGGCGAGGTTCCATTTTCTGTGATGAATGGGCTTATGGTTGGTGCATTGAAATGGAACCTCGCCAAAATCAACGGAGTCTGGGTTATGATGGATGGTGAACA  
GTCTGGGTTATGATGGATGGTGAACAAGTCGAATATCCGTTGAAACCAATCGTTGGAATGCAAAACCAACCCTGAAACCAATCGTTGGAATGCAAAACCAACCCTGAAACCAATCGTTGGAATGCAAAACCA  
CGGATATTCGACTTGTTCATCACCATCCATCATAACCCAGACTCCGTTGATGTTGGCGAGGTTCCATTTTCAATGCACAAACCATAGGCCATTTCATACAGAAATGGAACCTCGCCAAAATCAACGGAGTCTGGGTTATGAT  
CCAAAATCAACGGAGTCTGGGTTATGATGGATGGTGAACAAGTCGAATATCCGTTGAAACCAATCGTTGGAATGATGTCGCATGATTTGCCTAAGGGTGGTTTTGCATCTC  
AACGATGGTTTTCAACGGATATTCGACTTGTTCATCACCATCCATCAGCCAGACTCCGTTGATGTTGGCGAGGTTCCATTTTCAATGCACCAAACCATAGGCCATTTCATACAGAAATGGAACCTCGCCAAAATCAACGGAGTCTGGGTTATGATGGATGGTGAACA  
AAAATGGAACCTCGCCAAAATCAACGGAGTCTGGGTTATGATGGATGGTGAACAAGTCGAATATCCGTTGAAACCAATCGTTGGAATGCAAAACCAACCCTGAAACCAATCGTTGGAATGCAAAACCAACCCTGAAACCAATCGTTGGAATGCAAAACCA  
CATCATCTCAACGATTGGTTTTCAACGGATATTCGACTTGTTCATCACCATCCATCATAACCCAGACTCCGTTGATGTTGGCGAGGTTCCATTTTCTGTGATGAATGGG  
CTTCGAGTTGGTGCATTGAAAATGGAACCTCGCGAACGAGGTCTGGGTTATGATGGATGGTGAACAAGTCGAATATCCGTTGAAACCAATCGTTGAGAATGATGTCGCATGATTTGCCTAAGGGTGGTTTTGCATCTC  
TGCCTAAGGGTGGTTTTGCATCTCAACGATTGGTTTCAACGGATATTCGACTTGTTCATCACCATCCATCATAACCCAGACTCCGTTGATGTTGGCGAGGTTCCATTTGCATTTT  
ACCAAACCATAGGCCATTTCATACAGAAATGGAACCTCGCCAAAATCAACGGAGTCTGGGTTATGATGGATGGTGAACAAGTCGAATATCCGTTGAAACCAATGGTTGGGAA  
TGATGTCGCATGATTTGCCTAAGGGTGGTTTTGCATCTCAACGATTGGTTTCAACGGATATTCGACTTGTTCATCACCATCCATCATAACCCAGACTCCGTTGATGTTGGCGAGGTT  
TCATTTCTGTGATGAATGGGCTTATGGTTGGTGCATTGAAATGGAACCTCGCCAAAATCAACGGAGTCTGGGTTATGATGGATGGTGAACAAGTCGAATATCCGTTGAAACCA  
AATCGTTGGAATGCAAAACCAACCCTGAAACCAATCGTTGGAATGCAAAACCAACCCTGAAACCAATCGTTGGAATGCAAAACCAACCCTGAAACCAATCGTTGGAATGCAAAACCAACCCTGAAACCAATCGTTGGAATGCAAAACCA  
TGGCGAGGTTCCAGTTTCTGTGATGAATGGGCTTATGGTTGGTGCATTGAAATGGAACCTCGCCAAAATCAACGGAGTCTGGGTTATGATGGATGGTGAACAAGTCGAATAT  
CCGTTGAAACCAATCGTTGGAATGATGTCGCATGATTTGCCTAAGGGTGGTTTTGCATCTCAACGATTGGTTTCAACGGATATTCGACTTGTTCATCACCATCCATCATAACCCA  
GACTCCGTTGATGTTGGCGAGGTTCCATTTTCAATGCACCAAACCATAGGCCATTTCATACAGAAATGGAACCTCGCCAAAATCAACGGAGTCTGGGTTATGATGGATGGTGAACA  
GAACAAGTCGAATATCCGTTGAAACCAATCGTTGGAATGCAAAACCAACCCTGAAACCAATCGTTGGAATGCAAAACCAACCCTGAAACCAATCGTTGGAATGCAAAACCAACCCTGAAACCAATCGTTGGAATGCAAAACCA  
ATCCATCAGCCAGACTCCGTTGATGTTGGCGAGGTTCCATTTTCTGTGATGAATGGGCTTATGGTTGGTGCATTGAAATGGAACCTCGCCAAAATCAACGGAGTCTGGGTTATGATGGATGGTGAACAAGTCGAATATCCGTTGAAACCA  
ATGTTGATGGATGGTGAACAAGTCGAATATCCATTTGAAACCAATGGTTGAATCCAAACCAACCCTGAAACCAATCGTTGGAATGCAAAACCAACCCTGAAACCAATCGTTGGAATGCAAAACCAACCCTGAAACCAATCGTTGGAATGCAAAACCA  
CGACTTGTTCATCACCATCCATCATAACCCAGACTCCGTTGATGTTGGCGAGGTTCCATTTTCAATGCACCAAACCATAGGCCATTTCATACAGAAATGGAACCTCGCCAAAATCAACGGAGTCTGGGTTATGATGGATGGTGAACA  
CAACGGAGTCTGGGTTATGATGGATGGTGAACAAGTCGAATATCCATTTGAAACCAATCGTAGAATGATGTCGCATGATTTGCCTAAGGGTGGTTTTGCATCTCAACGATTGGT  
TTCAACGGATATTCAGGGAATG-3'

Рисунок 15 - Нуклеотидная последовательность одного из продуктов классической LAMP-амплификации кДНК вируса Y картофеля (цветовой заливкой выделены участки отжига соответствующих праймеров, цветом выделены специфические участки мишени)

### 3.2. Номенклатура продуктов LAMP с дополнительными праймерами

В более продуктивных LAMP-реакциях с дополнительными праймерами (петлевыми праймерами, стержневыми праймерами, множественными внутренними праймерами) структура лампиконов выглядит еще сложнее. Но подчиняясь логике процессов, заложенных в устройстве праймеров и в местах их отжига на мишени, а также в особенностях используемой ДНК-полимеразы с цепь-вытесняющей активностью, она принципиально совпадает с генеральной линией размножения цепей в стандартной LAMP-реакции без использования дополнительных праймеров. Отличия выражаются в том, что некоторые лампиконы и цепи в них ограничиваются зонами, на которых отжигаются, как петлевые, так и стержневые праймеры, что приводит к тому, что часть лампиконов становятся лишь наполовину гантелеподобными структурами и будут выключаться из дальнейшего экспоненциального размножения. Тем самым в LAMP-реакции с петлевыми (LAMP-Loop) и стержневыми праймерами (STEM-LAMP) возникает гораздо больше тупиковых лампиконов различных размеров. Что касается LAMP-реакции, со множественными внутренними праймерами (MIP-LAMP), то она в плане характера размножения отличается от стандартной LAMP-реакции только тем, что в ней возникает четыре разных гантелеподобных структуры, каждая из которых образует свои LAMP-циклы, при этом лампиконы более крупных размеров способны формировать подобные меньшего размера, также иницирующие свои LAMP-циклы.

Обозначения, использованные выше при описании стандартной LAMP-реакции в виде многоточий, подчеркивания, двойного подчеркивания, изображения водородных связей || в конкретных зонах, буквенных обозначений 'dmb', 'hp', 'li', Z, Zz, T и вкладывающийся в них смысл, останутся в силе, но к ним добавится еще «полугантель» sdmb (semi-dumbbell). Также добавятся двухбуквенные обозначения некоторых

неключевых цепей в виде зон на 5'- и 3'-концах. Места отжига на мишени дополнительных праймеров для разных вариантов LAMP будут обозначаться разными буквами латинского алфавита во избежание путаницы.

Ни Loop-, ни Stem-праймеры не обеспечивают значительного повышения эффективности реакции, и перспективнее выглядят варианты LAMP со множественными внутренними праймерами, ряд которых предложен ранее (Wang et al., 2015; 2016; Lamalee et al., 2023). Однако из-за существенного увеличения длины мишени и повышенной вероятности димеризации праймеров эти варианты LAMP не стали популярными. Так, в одной из работ периода пандемии коронавируса SARS-CoV-2 был описан метод RT-MIP-LAMP, который при использовании двух пар внутренних праймеров показал преимущество по чувствительности и скорости получения результатов по сравнению с обычной RT-LAMP. Но стоило увеличить до трех пар число внутренних праймеров, как началась неспецифическая амплификация (He et al., 2022). Также серьезным недостатком подобных LAMP-реакций с увеличенным числом внутренних праймеров является увеличенный размер мишени.

Компромиссным вариантом может быть использование лишь одного дополнительного внутреннего праймера, что будет напоминать "полувложенную" (semi-nested) ПЦР. Однако в ней "вложенные" праймеры вступают в амплификацию позже, что достигается за счет температурных различий в отжиге праймеров или каким-либо барьерным способом. Для LAMP-реакции эти подходы неприемлемы, потому мы назвали такую реакцию "псевдо-полувложенная" LAMP (ппв-LAMP). Ее преимуществом перед вариантами MIP-LAMP служит то, что добавляется всего два места отжига, что не сильно увеличивает длину мишени и делает ее сопоставимой по этому показателю с вариантами LAMP с Loop или Stem праймерами, но при этом обеспечивающей гораздо более высокий уровень размножения цепей ДНК (рисунок 16). Характер размножения цепей будет одинаков как для праймеров FIP + eFIP + VIP, так и наоборот: для FIP + VIP + eVIP.

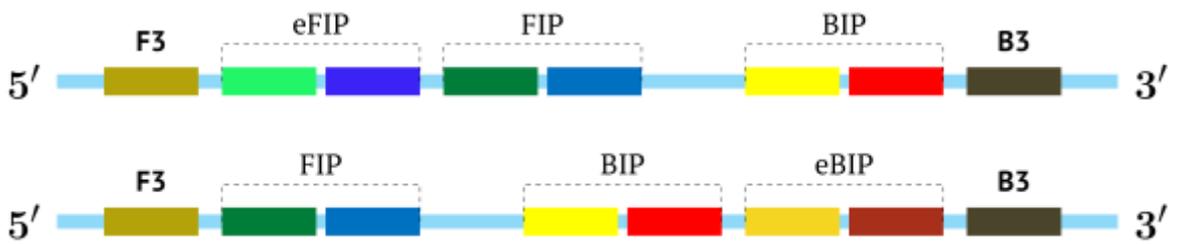
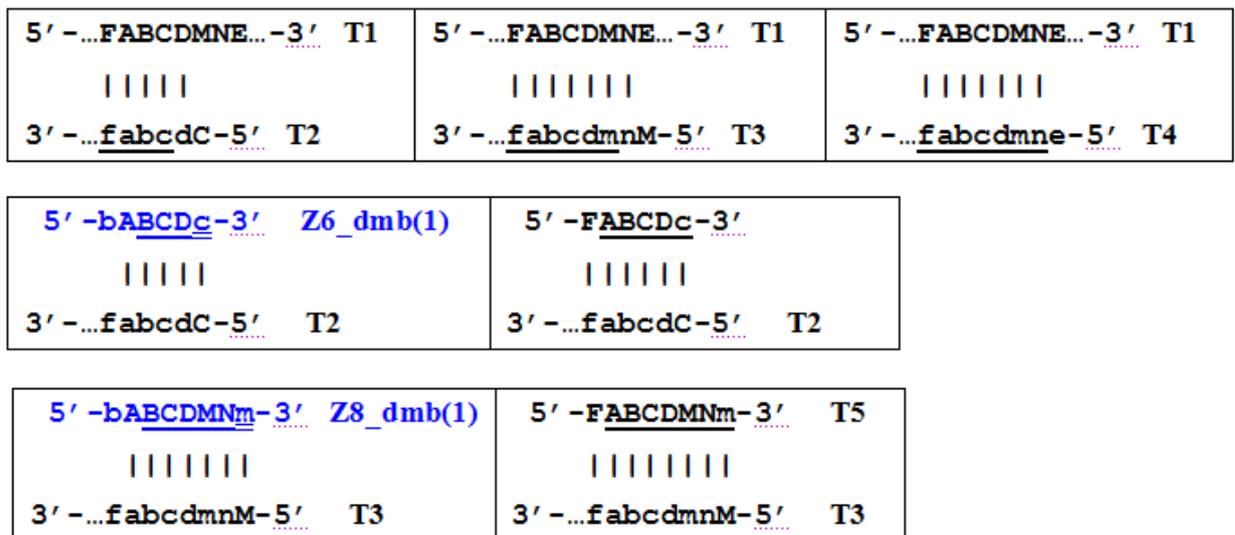


Рисунок 16 - Схемы расположения зон отжига праймеров на мишени в ппв-LAMP в двух ее вариантах и их привычные обозначения (eFIP and eBIP - дополнительные (extra) внутренние праймеры)

Для лучшего объяснения данного варианта LAMP необходимо перейти на ранее примененную кодировку зон и праймеров. Так, в ппв-LAMP в однобуквенной кодировке в одном из вариантов расположения FIP и BIP праймеров мишень будет выглядеть как 5'-...FABCDMNE...-3', а праймерами будут служить F, bA, Cd, Mn, e. Продукты преамплификационной фазы реакции могут быть отображены следующим образом:



В результате в ходе преамплификационной фазы ппв-LAMP сформируется два типа гантелеподобных структур: bABCDc (Z6\_dmb(1)) и bABCDMnm (Z8\_dmb(1)). При их вхождении в LAMP-цикл появятся симметричные им структуры CdcbaV (Z6\_dmb(2)) и Mnmcdcbav (Z8\_dmb(2)). Оценить скорость приращения лампликонов в ходе одного основного LAMP-цикла в ппв-LAMP можно увидеть из рисунке 17.

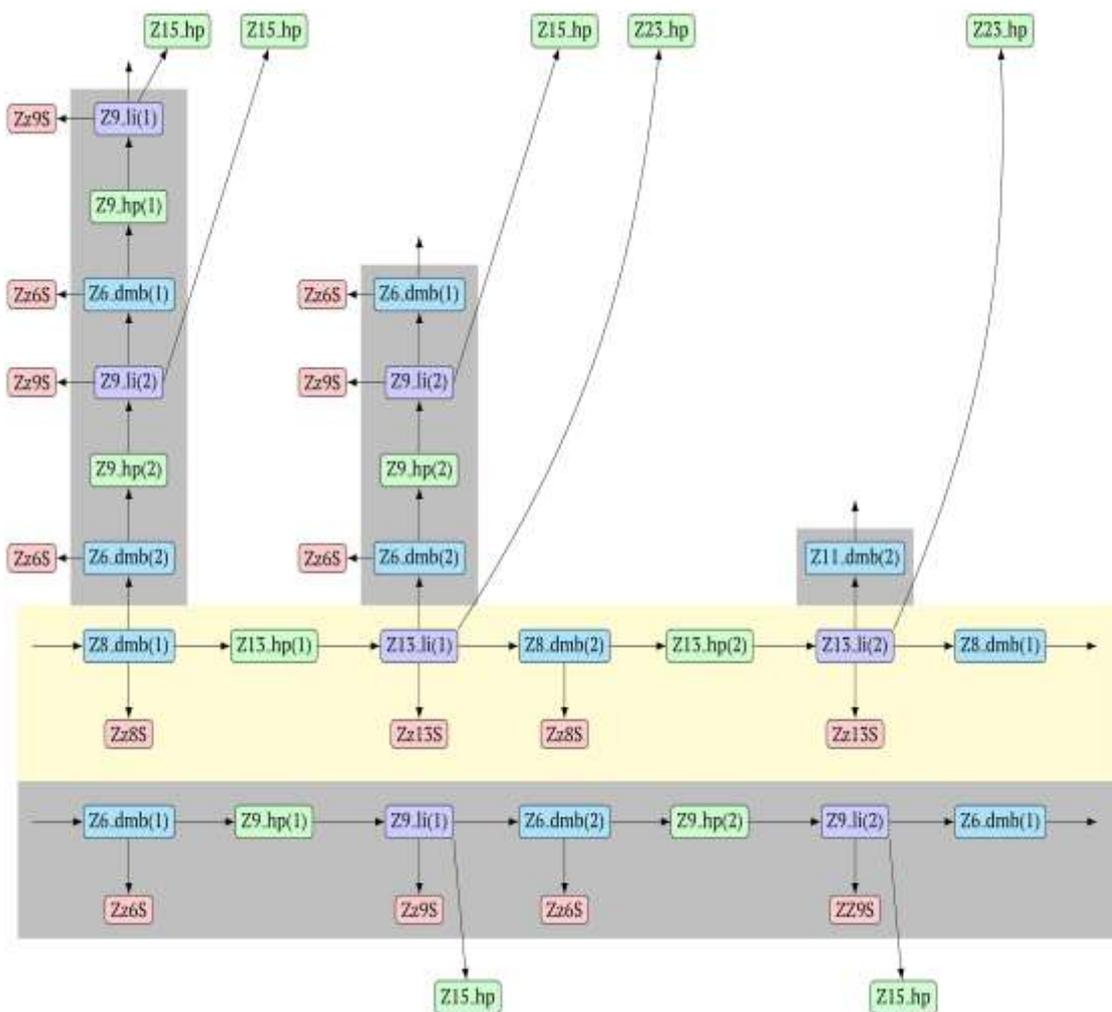


Рисунок 17 - Каскад циклических процессов, протекающих в ппв-LAMP. Желтым фоном показана последовательность основных событий LAMP-цикла, начиная с вхождения в циклический процесс одновременно Z8\_dmb(1) и Z6\_dmb(1), образовавшихся в ходе предамплификации. Серым фоном выделены позже начинающиеся процессы амплификации, идущие в рамках основного цикла до момента, когда завершится полный цикл основной реакции. Красным цветом обозначены тупиковые лампиконы. Горизонтальными линиями ограничен основной каскад циклических процессов, за пределы которого во внешний контур, переходя к стадии NGEL, выходят лампиконы Z15\_hp и Z23\_hp

При переходе ппв-LAMP к экспоненциальной фазе возникает два LAMP-цикла в одном, сопровождаемые субциклами, что можно видеть из представленной на рисунок 18 упрощенной схемы этих процессов без

указания тупиковых лампиконов. Отдельного внимания заслуживает возникающий лампикон Z11\_dmb(2), генерирующий собственные субциклы.

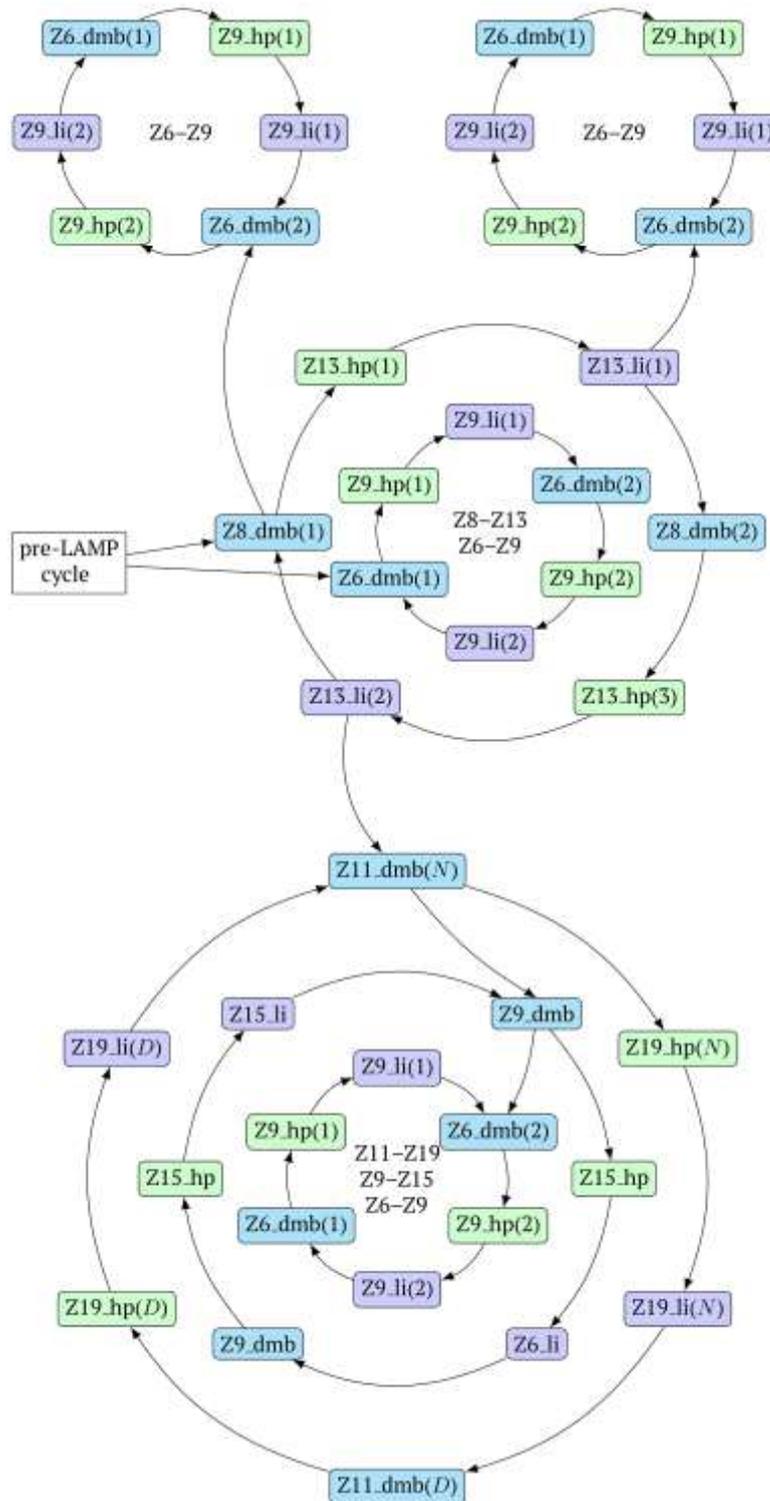
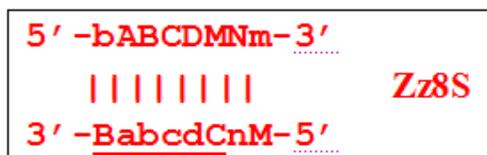


Рисунок 18 - Упрощенная схема протекания LAMP-цикла в пvp-LAMP с дополнительными субциклами

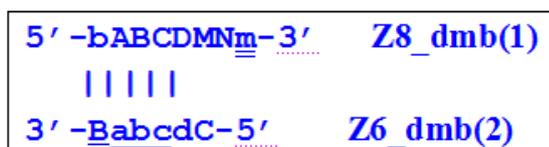
Вариант ппв-LAMP протекает в целом сходным образом с классической LAMP с тем отличием, что после предамплификации в реакционной смеси изначально появятся структуры  $dmb$  двух размеров:  $Z8\_dmb(1)$  и, как ее производное,  $Z6\_dmb(1)$ . Структура  $Z6\_dmb(1)$  ведет себя аналогично тому, как это имеет место в классической LAMP-реакции, тогда как  $Z8\_dmb(1)$  сразу сгенерирует еще одну структуру  $Z6\_dmb(2)$ , которая через  $dmb(1)$  придет опять к  $dmb(2)$ . Затем  $Z8\_dmb$  сгенерирует еще одну подобную  $Z6\_dmb(2)$  структуру.

В ппв-LAMP с учетом условного запаздывания элонгации цепей (что выделено серым фоном) образуется 15 тупиковых лампликонов ( $Zz6S - 6$ ,  $Zz8S - 2$ ,  $Zz9S - 5$ ,  $Zz13S - 2$ ) и еще 7 лампликонов выходит за контур ( $Z15\_hp - 5$ ,  $Z23\_hp - 2$ ). В классической LAMP количества лампликонов выглядят намного скромнее: по два каждого из  $Zz6S$ ,  $Zz9S$  и  $Z15\_hp$ . Важное значение для ускорения размножения цепей в LAMP имеет также количество лампликонов увеличенного размера, выходящих в следующий контур. Что касается основного типа лампликонов  $Z6\_dmb$ , то в классической LAMP-реакции сколько копий таковых в каждый LAMP-цикл вошло, столько же и выходит. Такая же ситуация с лампликонами  $Z8\_dmb$  в ппв-LAMP, но при этом в ней вместо одного зашедшего лампликона  $Z6\_dmb$  их выходит из каждого LAMP-цикла в 3 раза больше. В дополнение к ним в конце LAMP-цикла образуется еще новая структура  $Z11\_dmb$ , которая сформирует свой субцикл. С помощью однобуквенного кодирования удобно проследить развитие ппв-LAMP. Поскольку образовавшийся во время предамплификационной фазы лампликон  $bABCDc$  ( $Z6\_dmb(1)$ ) ведет себя аналогично таковому в обычной LAMP, то его превращений здесь касаться не будем. Что касается лампликона  $bABCDMNm$  ( $Z8\_dmb(1)$ ), из него возникнет еще два лампликона  $Z6\_dmb(2)$ , которые также будут повторять стандартный LAMP-цикл, «направленный» на рис. 3.10 вверх и выделенный серым фоном на разную высоту в соответствии с процессами,

происходящими в основном LAMP-субцикле. Итак, из Z8\_dmb(1) возникают следующие структуры:



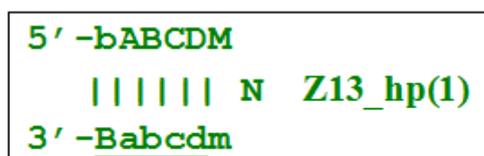
Когда при отжиге праймера 'Mn' образуется тупиковый лампликон Zz8S, а при отжиге до него праймера 'Cd', образуется смещаемая цепь Z6\_dmb(2), способная инициировать новый LAMP-цикл.



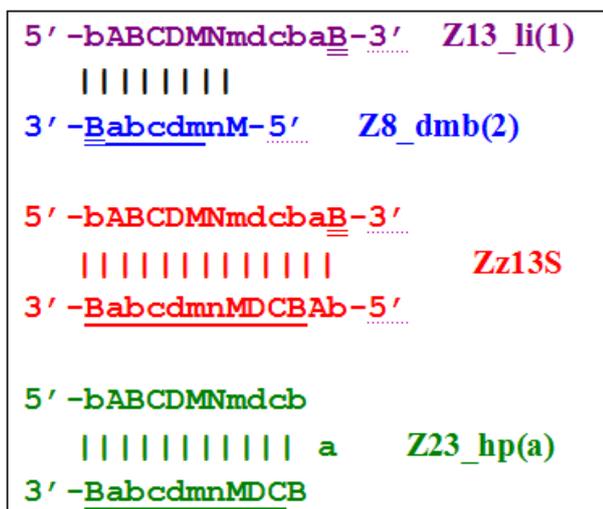
В то же время на цепи Z6\_dmb(2) может отжечься праймер 'bA' что приведет к тупиковому лампликону Zz6S:



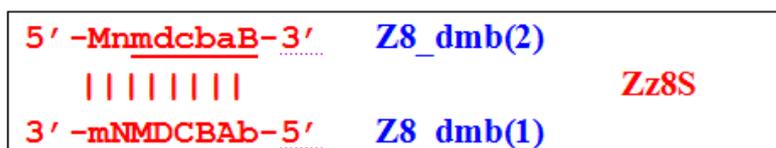
Также для структуры Z8\_dmb(1) существует вероятность самопраймирования с образованием лампликона Z13\_hp(1):



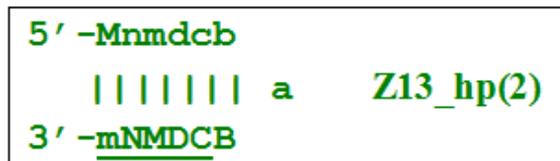
на шпильке которого способен отжечься праймер 'Mn' (сначала одной зоной 'n'), приводящий к раскрытию данной шпильки и формированию структуры Z13\_li, содержащей также цепь Z8\_dmb(2). Она может быть смещена за счет отжигшегося выше праймера 'bA' или за счет самопраймирования, приводящего к лампликону Z23\_hp:



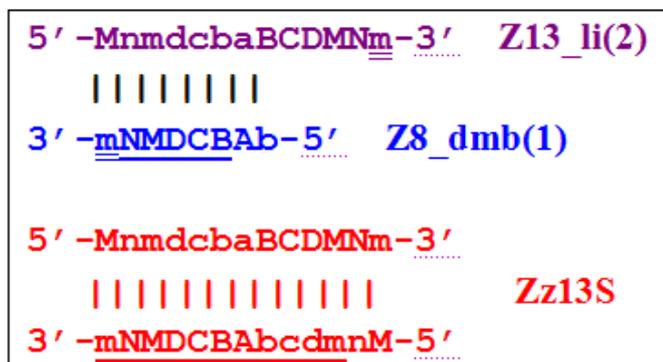
После того как цепь Z8\_dmb(2) так или иначе будет смещена она способна образовать тупиковый лампикон Zz8S:



Z8\_dmb(2) также может сформировать шпильчатую структуру Z13\_hp(2):

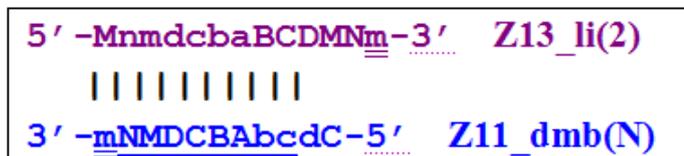


Структура Z13\_hp(2) с петлей в виде зоны 'а' за счет отжига на ней праймера 'bA' (сначала зоной 'A') приведет к раскрытию шпильки и образованию Z13\_li(2), несущего цепь Z8\_dmb(1), после чего отжиг и элонгация праймера 'Mn' приведет к тупиковому лампикону Zz13S:

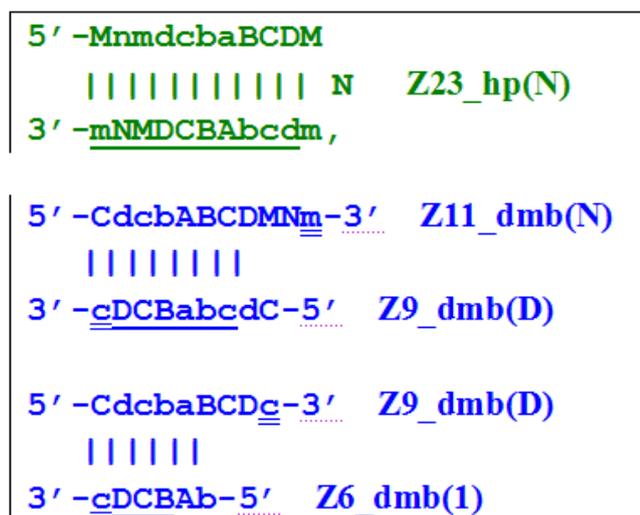


Смещение лампикона Z8\_dmb(1) завершит LAMP-цикл и одновременно начнет новый.

Особенностью цепи Z13\_li(2), в отличие от аналогичной ей Z13\_li(1), является то, что на ней способен отжечься праймер 'Cd', что обеспечит формирование линии лампиконов нового размерного ряда, стартового со структуры Z11\_dmb(N), где вместо '1' или '2' указывается тип петли:



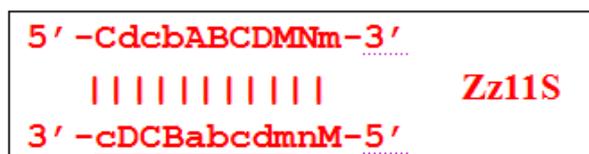
В рамках того же LAMP-цикла возникнет новая смещаемая гантелеподобная цепь Z11\_dmb(1), что приведет к тому, что из первого LAMP-цикла для ппв-LAMP в субцикл выйдет дополнительная несколько удлиненная dmb-структура. Она превратится в Z19\_hr, выйдет в следующий этап NGEL и через временную структуру Z9\_dmb сформирует очередной ключевой лампикон Z6\_dmb(1), иницируя свой LAMP-цикл. Что касается цепи Z13\_li(2) то ее самопраймирование приведет к шпилечной структуре Z23\_hr, которая выйдет в следующий контур, также как производные Z11\_dmb продолжит превращения уже в следующей NGEL стадии:



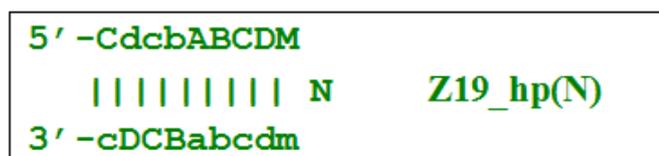
Помимо образования Z6\_dmb(1), лампикон Z9\_dmb(D) путем отжига на его петле праймера 'Cd' превратится в шпилечную структуру Z15\_hr(D), а затем при отжиге праймера 'Cd' (поначалу зоной 'd') станет структурой Z15\_li:



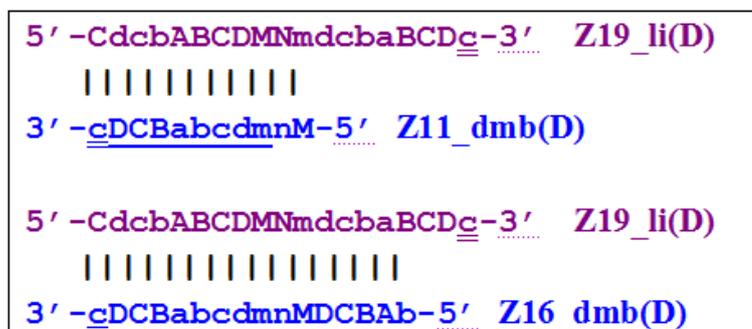
При инициации LAMP-субцикла, в который выйдет цепь Z11\_dmb, при отжиге праймера 'Mn' возникнет тупиковый лампликон Zz11S:



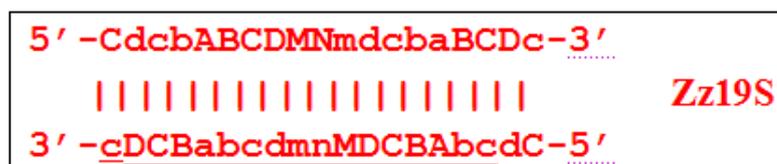
тогда как самопраймирование приведет к шпильчатой структуре Z19\_hp:



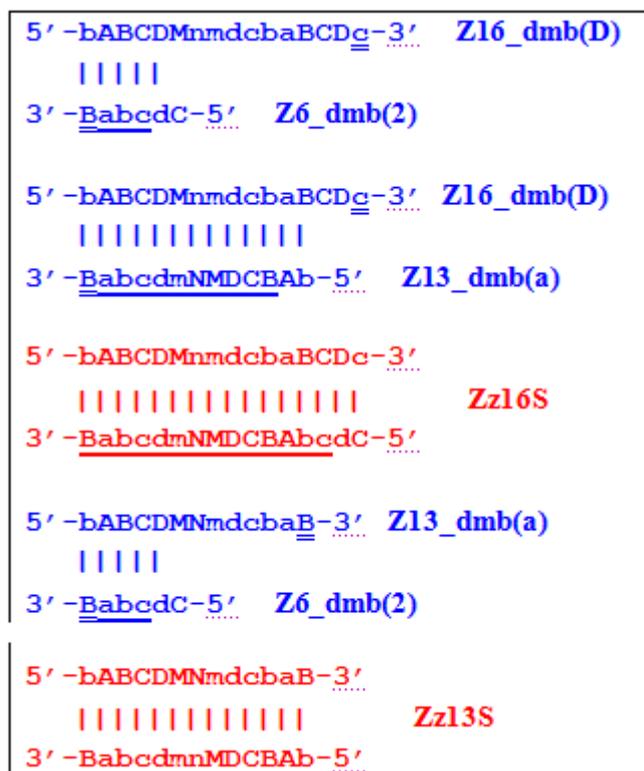
которая затем линейзуется с образованием после отжига и элонгации праймеров 'Mn' и 'bA' следующих структур:



а после отжига праймера 'Cd' возникнет тупиковый лампликон Zz19S:



Что касается лампликона Z16\_dmb(D), то он путем отжига на нем трех праймеров 'Cd', 'bA' и 'Cd', а также самопраймирования претерпит следующие превращения:



Увеличение размеров лампиконов в ппв-LAMP идет по тем же законам, и при переходе от структуры Z\_dmb к ее производной структуре Z\_hr приращение происходит путем фактического удвоения за вычетом трех зон мишени. То есть, стартуя с Z8\_dmb, размеры последующих лампиконов по числу зон будут следующие: Z8 → Z13 → Z23 → Z43 → Z83 → Z163 и т.д. Это основная линия лампиконов, но как говорилось выше, впоследствии обязательно появляются другие, стартовые уже с лампиконов с изначально большим числом зон. Использование одного дополнительного внутреннего праймера дает определенное преимущество, поскольку на мишени предстоит выбрать места отжига или двух FIP и одного VIP, либо наоборот. И это зависит от конкретных последовательностей мишени.

### 3.3. Альтернативные варианты LAMP-реакции

Традиционные варианты LAMP разработаны для обнаружения нуклеотидных последовательностей НК-мишеней, которые являются частью протяженных цепей НК. В этом случае элонгация LAMP-праймеров обеспечивает образование гантелеобразной структуры, амплификация которой приводит к лампиконам. Реакцию LAMP можно использовать и для обнаружения таких мишеней, как микроРНК или другие короткоцепочечные НК. В случае с микроРНК приходится иметь дело с короткой (около 20-25 нт) мишенью. Однако несомненным преимуществом микроРНК является то, что их размер и нуклеотидная последовательность четко детерминированы. Это позволяет конструировать LAMP-системы, специфичные для каждой конкретной микроРНК.

Нами предлагается два подхода для обнаружения микроРНК с помощью LAMP-амплификации. Первый был назван mirLAMP, соответствующая ему молекулярная схема представлена на рисунке 19.

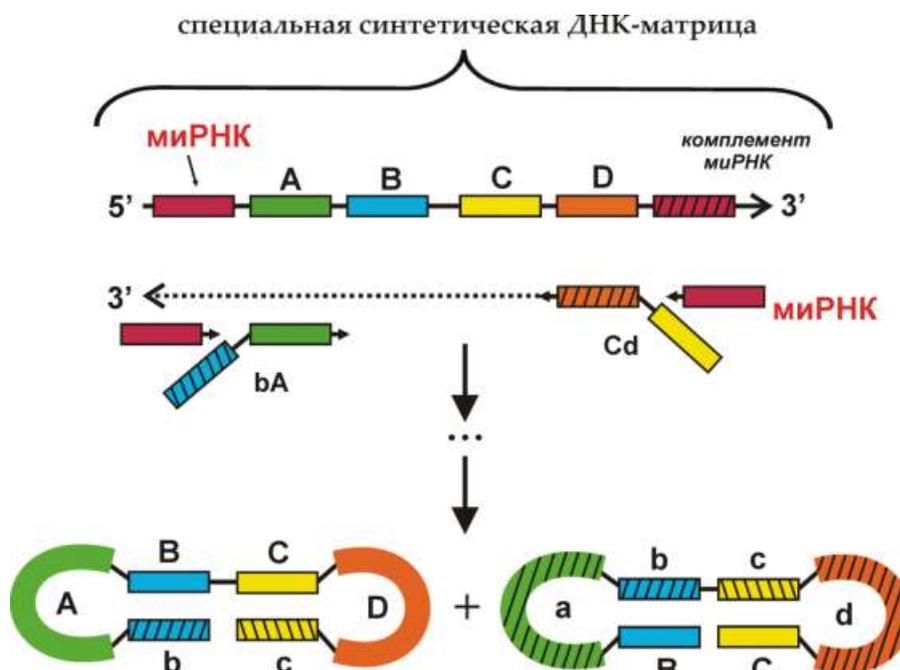


Рисунок 19 - Структура специальной ДНК-матрицы и праймеров и принцип обнаружения микроРНК с помощью mirLAMP

Ключевым компонентом является специальная ДНК-матрица, последовательность которой содержит участки отжига праймеров FIP (bA) и VIP (Cd). На 5'-конце данной матрицы находится последовательность, полностью гомологичная последовательности анализируемой микроРНК, а на 3'-конце – последовательность, комплементарная ей. Пред-амплификационная стадия LAMP запускается за счет отжига первого праймера (согласно схеме, это праймер Cd) и микроРНК, элонгация которой обеспечивает вытеснение цепи, построенной за счет элонгации Cd. На вновь построенной цепи отжигается второй праймер (bA) и микроРНК. В результате образуются гантелеобразные структуры, запускающие стандартные LAMP-циклы.

Второй подход был назван ligLAMP, соответствующая ему молекулярная схема представлена на рисунке 20

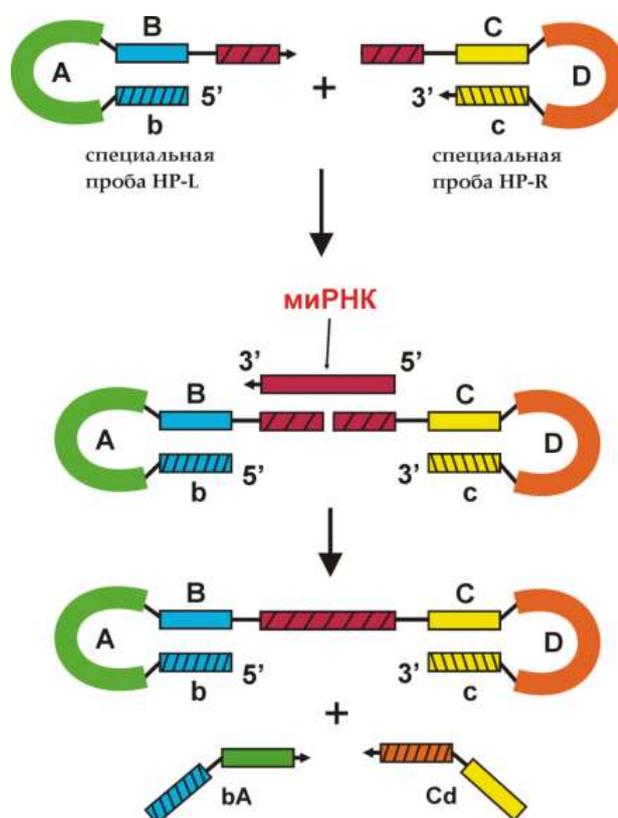


Рисунок 20 - Структура специальных HP-проб и принцип обнаружения микроРНК с помощью ligLAMP

В случае ligLAMP ключевыми структурами являются специальные олигонуклеотидные пробы HP-L и HP-R. Обе пробы существуют при нормальных условиях в виде шпилек со "свисающим" 5'-концом (HP-R) или 3'-концом (HP-L). Указанные концевые мотивы комплементарны последовательности анализируемой микроРНК, и при ее наличии в реакционной смеси происходит их отжиг "встык" на микроРНК. При добавлении лигазы происходит лигирование и образование гантелеобразной структуры, далее запускающей стандартные LAMP-циклы в присутствии праймеров bA и Cd.

Предлагаемые выше подходы mirLAMP и ligLAMP требуют конструирования специальных ДНК-матрицы и проб, что не позволяет осуществить ни одна из известных программ подбора LAMP-праймеров. Нами написаны соответствующие программы для дизайна специальных ДНК-матрицы, проб и праймеров, которые рассмотрены далее в разделе 3.5.2. Экспериментальные данные по отработке данных подходов представлены в разделе 3.6.2.

### **3.4. Алгоритмы дизайна LAMP-праймеров**

Подбор праймеров для LAMP представляет собой нетривиальную задачу и требует разработки специальной компьютерной программы с должным функционалом. Известно не более десятка программ для подбора LAMP-праймеров, каждая из которых имеет ряд ограничений. Недостаток инструментов для дизайна качественных LAMP-праймеров обуславливает необходимость разработки новых компьютерных программ с оптимизированным алгоритмом их подбора.

#### *3.4.1. Дизайн LAMP-праймеров на основе существующих алгоритмов*

С точки зрения математики, задачу поиска праймеров можно считать задачей поиска подстроки в строке, где праймер будет являться подстрокой, а

нуклеотидная последовательность мишени – строкой. Пусть задан некий текст  $A$ , именуемый подстрокой (праймером), и более длинная строка  $T$ , именуемая строкой (нуклеотидной последовательностью). Задача будет заключаться в распознании всех вхождений подстроки  $A$  в строке  $T$ . В случае стандартной LAMP нужно найти 6 подстрок, в расширенной LAMP – 8 подстрок в более длинной строке. Существует ряд алгоритмов, которые могут быть применены к решению данной задачи. Однако учитывая тот факт, что для LAMP необходимо подбирать большее количество праймеров по сравнению с ПЦР, следует рассматривать только алгоритмы, позволяющие искать сразу несколько вхождений подстроки в строке. Таковыми являются алгоритмы Рабина-Карпа (РК) и Ахо-Корасика (АК).

Алгоритм РК основан на предварительном хешировании первоначальной подстроки. Для реализации данного алгоритма был применен язык программирования Python - высокоуровневый язык программирования общего назначения с динамической строгой типизацией и автоматическим управлением памяти (Yogesh, 2019, Федоров, 2019). Он содержит Biopython – набор модулей, которые предоставляют функции для работы с ДНК, РНК и белковыми последовательностями. Для оценки работы алгоритма РК был реализован параллельный поиск праймеров (2 и 4 процесса), позволяющий производить одновременный поиск нескольких подстрок в строке (табл. 4).

Таблица 4 - Продолжительность поиска праймеров в нуклеотидных последовательностях разной длины с помощью алгоритма РК (в секундах)\*.

Длина \ Вид поиска	1 млн	5 млн	10 млн	50 млн	100 млн
Алгоритм РК, с	1,07	5,68	10,98	56,81	109,67
Алгоритм РК 4 процесса, с	1,4	2,68	4	16,29	31,95
Алгоритм РК 2 процесса, с	1,1	3,27	6,21	29,5	60,2

\* Расчеты проводились на ПК с характеристиками: процессор Intel(R) Core(TM) i3-3210 CPU 3,20 ГГц; 2 ядра; ОЗУ 8 ГБ.

В сравнительной таблице 4 указаны длины нуклеотидных последовательностей и время (сек) поиска всех фрагментов, удовлетворяющих заданным параметрам, в зависимости от вида поиска. Установлены следующие параметры: GC-состав (40-60%), длина праймеров (18-25 нуклеотидов), температура отжига (55-65°C).

Алгоритм АК основан на построении конечного автомата. Изначально загружается нуклеотидная последовательность и задаются характеристики праймеров: длина, GC-состав, температура отжига. На рисунке 21 представлены графики зависимости продолжительности поиска праймеров от размера взятой нуклеотидной последовательности для последовательного и многоядерного поиска (2 ядра). Среднее ускорение составило 1,78.

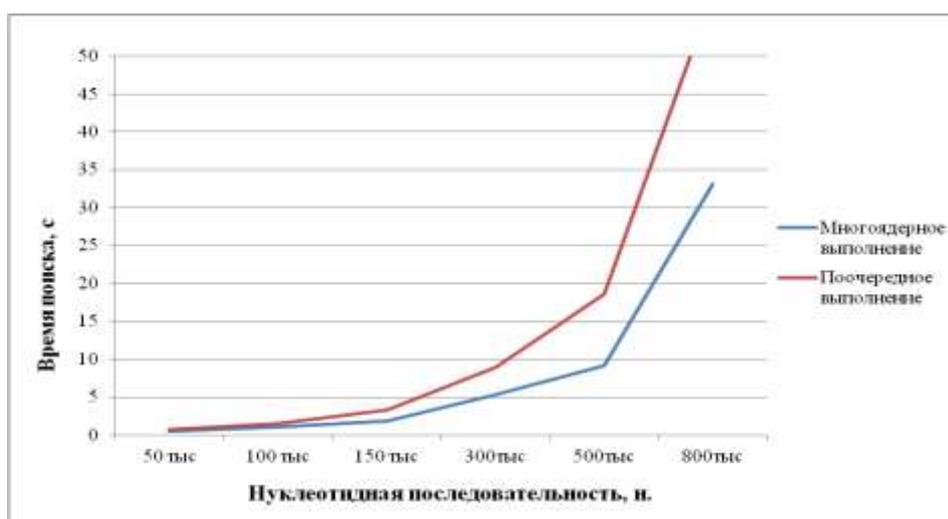


Рисунок 21 - Продолжительность подбора праймеров в зависимости от длины нуклеотидной последовательности

Алгоритмы РК и АК целесообразно применять в случаях, когда уже известна последовательность, которую необходимо найти, а для достижения цели и задач, поставленных в данной работе, рассмотренные выше алгоритмы удовлетворяют не в полной мере, поскольку имеются определенные критерии подбора праймеров для проведения LAMP-амплификации, которые необходимо учитывать параллельно с их поиском.

### 3.4.2. Дизайн LAMP-праймеров на основе собственного алгоритма

Учитывая длины нуклеотидных последовательностей и особенности дизайна праймеров для LAMP, целесообразно разработать новый алгоритм их подбора, обеспечивающий точный (98-100%) и быстрый (менее 2 мин) поиск. Одним из критериев дизайна праймеров является содержание гуанина (G) и цитозина (C), которое должно находиться в пределах 40-60%. GC-состав влияет на температуру отжига праймеров  $T_m$ . Известно несколько формул расчета  $T_m$ , например, следующие:

$$T_m = \Delta H / \Delta S - 273.15 \quad (1)$$

где  $\Delta H$  – энтальпия системы,  $\Delta S$  – энтропия системы.

$$T_m = 4 \cdot (N_c + N_g) + 2 \cdot (N_a + N_t) \quad (2)$$

где a – аденин, t – тимин, c – цитозин, g – гуанин.

$$T_m = 2 \cdot (L + G + C) \quad (3)$$

где L – длина праймера, G и C – количество гуанинов и цитозинов.

$$T_m = 81.5 + 16.6 \cdot (\log_{10}[Na^+]) + 0.41 \cdot (\%G + \%C) - \frac{600}{length} \quad (4)$$

где length – размер амплифицируемого участка.

Нами была выведена новая формула (5) для расчета температуры отжига LAMP-праймеров:

$$T_m = 78.327 + 17.127 \cdot (\lg[Na^+]) + 0.461 \cdot (GC_{ij}) - \frac{491.84}{L} \quad (5)$$

где L – длина праймера;  $(Na^+)$  – молярная концентрация однозарядного катиона;  $\%G + \%C$  – процентное содержание G и C.

Формула (5) была выведена с учетом необходимости расчета  $T_m$  для более протяженных LAMP-праймеров и для обеспечения большего соответствия значений  $T_m$  праймеров значениям температуры, получаемым с помощью удобной онлайн-утилиты OligoAnalyzer (<https://eu.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>), обеспечивающей качественный подбор праймеров для различных видов реакций амплификации. Формула была выведена решением обратных задач, и за ее

основу была взята зависимость (4), доступная из открытых источников (например, <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>) и предложенная ранее для расчета  $T_m$  праймеров привычной длины. Все четыре коэффициента уравнения были определены с помощью метода параболического спуска (Спивак и др., 2003).

Для оценки точности формулы (5) сравнивали значения  $T_m$ , полученные с ее помощью, со значениями, полученными онлайн-утилитой OligoAnalyzer и выдаваемыми формулой (4). В качестве модели задавали праймеры различной длины (от 18 до 51 нт, с шагом в 3 нт) и с различным GC-составом (40%, рисунок 22 (А); 50%, рисунок 22 (Б); 60%, рисунок 22 (В)).

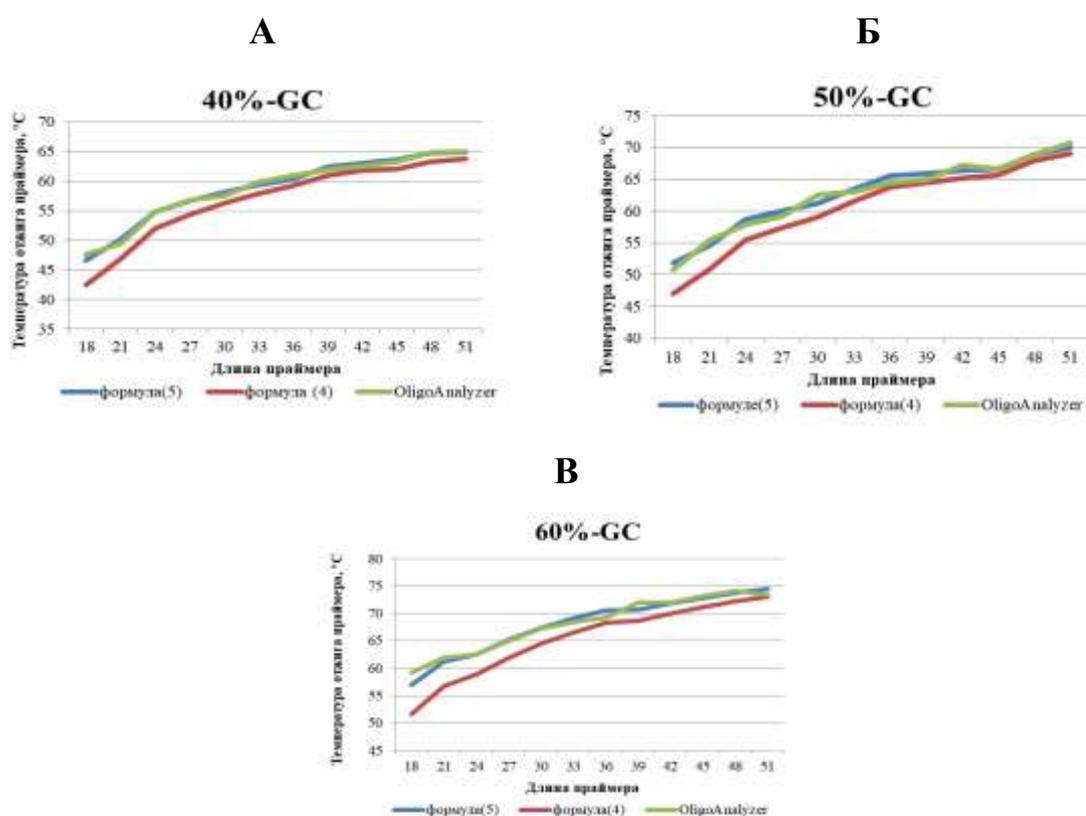


Рисунок 22 - Сравнение значений  $T_m$ , полученных с помощью различных формул расчета при разных GC-составах (40%, 50%, 60%)

По полученным данным видно, что расчетные значения  $T_m$ , полученные с помощью формулы (5), более близки к значениям, полученным

с помощью OligoAnalyzer (среднее отклонение: при GC-составе 40% - 0,016, 50% - 0,21, 60% - 0,9). Это свидетельствует о том, что результаты амплификации с праймерами, температура которых рассчитывалась по формуле (5), могут быть более достоверными.

Учитывая, что длина праймеров, GC-состав и  $T_m$  теперь известны, можно найти в длинной анализируемой последовательности все короткие фрагменты, которые будут удовлетворять данным критериям. За основу поиска целесообразно взять прямой поиск, так как необходимо перебрать все нуклеотиды в исследуемом участке, усложнив его за счет расчета GC-состава и  $T_m$  (рисунок 23). Расчет GC-состава происходит только для первой нуклеотидной последовательности, далее алгоритм обращает внимание только на последний (добавленный), либо же на первый (исключенный из последовательности) нуклеотид, и если тот является нуклеотидом С или G, то состав пересчитывается, если нуклеотид иной (А или Т), то происходит сдвиг на одну позицию анализируемой последовательности и поиск возможных праймеров продолжается.

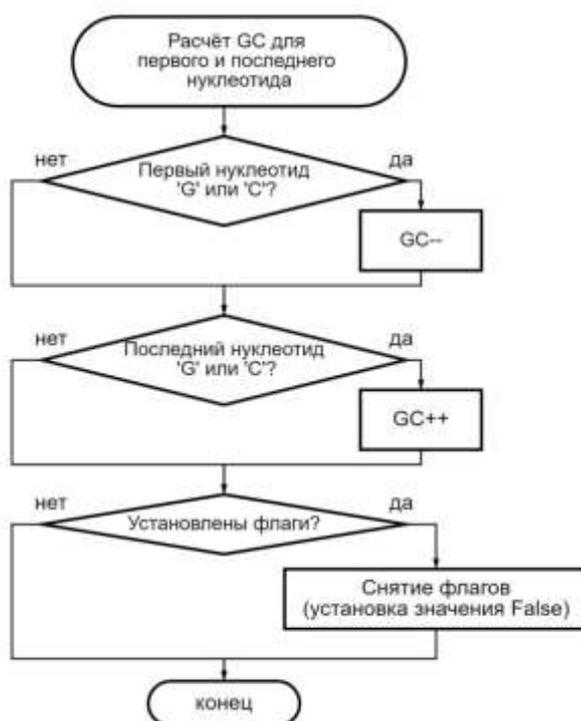


Рисунок 23 - Блок-схема расчета GC-состава (40-60%)

Алгоритм поиска праймеров длиной  $n$ :

1. Определяется GC-состав первых  $n-1$  нуклеотидов (40-60%) и исключаются фрагменты с четырьмя одинаковыми нуклеотидами.

2. Вычисляются  $T_m$  и GC-состав для участка от  $i$  до  $i+n$  (рисунок 24). Если параметры соблюдены, переходят к следующему шагу. В противном случае возвращаются к шагу 1.

3. Проверяется наличие гомодимеров. При их отсутствии последовательность добавляется в массив праймеров.

Аналогично анализируется комплементарная цепь.

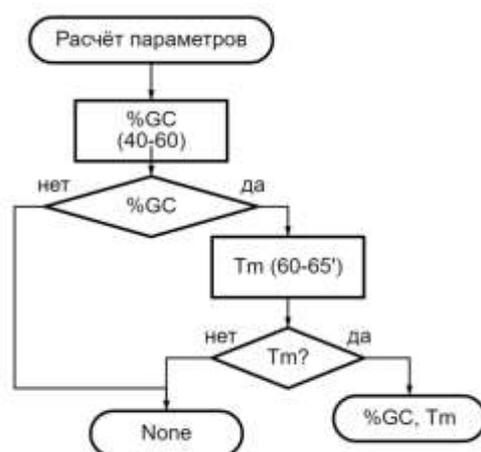


Рисунок 24 - Блок-схема расчета температуры отжига праймеров

Схематично процесс поиска праймеров для LAMP-амплификации можно представить в виде следующей блок-схемы:

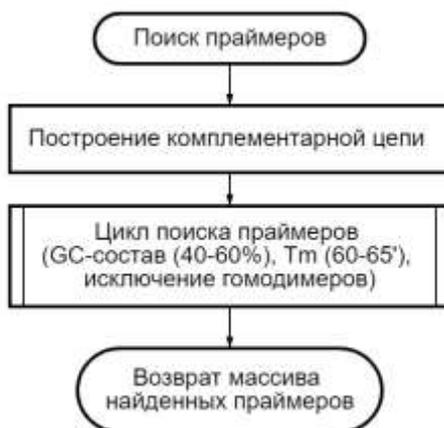


Рисунок 25 - Блок-схема метода прямого перебора

Полная блок-схема работы метода прямого перебора выглядит следующим образом:



Рисунок 26- Полная блок-схема работы метода прямого перебора

Для оценки применимости алгоритма проведено его тестирование путем поиска праймеров на нуклеотидных последовательностях различной структуры и длины (таблица 5). Оказалось, что метод прямого поиска обеспечивает достаточную скорость подбора праймеров даже для протяженных последовательностей.

Таблица 5 - Продолжительность поиска праймеров методом прямого перебора для последовательностей разной длины.

Организм	Размер генома, п.о.	Продолжительность поиска праймеров, с
SARS-CoV-2	29 844	0,31
<i>Escherichia virus T4</i>	168 903	1,73
<i>Mycoplasma genitalum</i>	580 076	5,43
<i>Helicobacter pylori</i>	1 624 458	18,11
<i>Escherichia coli</i>	4 641 652	71,68 (1,2 мин)
<i>Caenorhabditis elegans</i>	100 286 401	1082,53 (18 мин)

На следующем этапе необходимо сформировать наборы из всех найденных праймеров, учитывая расстояние между ними, размер участка для амплификации, возможность димеризации, а также разницу температур отжига праймеров в одном наборе ( $\Delta T_m < 3$ ). Блок-схема дизайна LAMP-праймеров в наборы представлена на рисунке 27. На вход подается нуклеотидная последовательность, которую можно ввести через буфер обмена или же загрузить файл определенного формата. Далее устанавливаются критерии подбора, такие как длина праймеров, GC-состав, температура отжига. Затем происходит поиск всех возможных праймеров, удовлетворяющих установленным критериям. Подобранные праймеры сортируются в наборы и выводятся на экран пользователя.

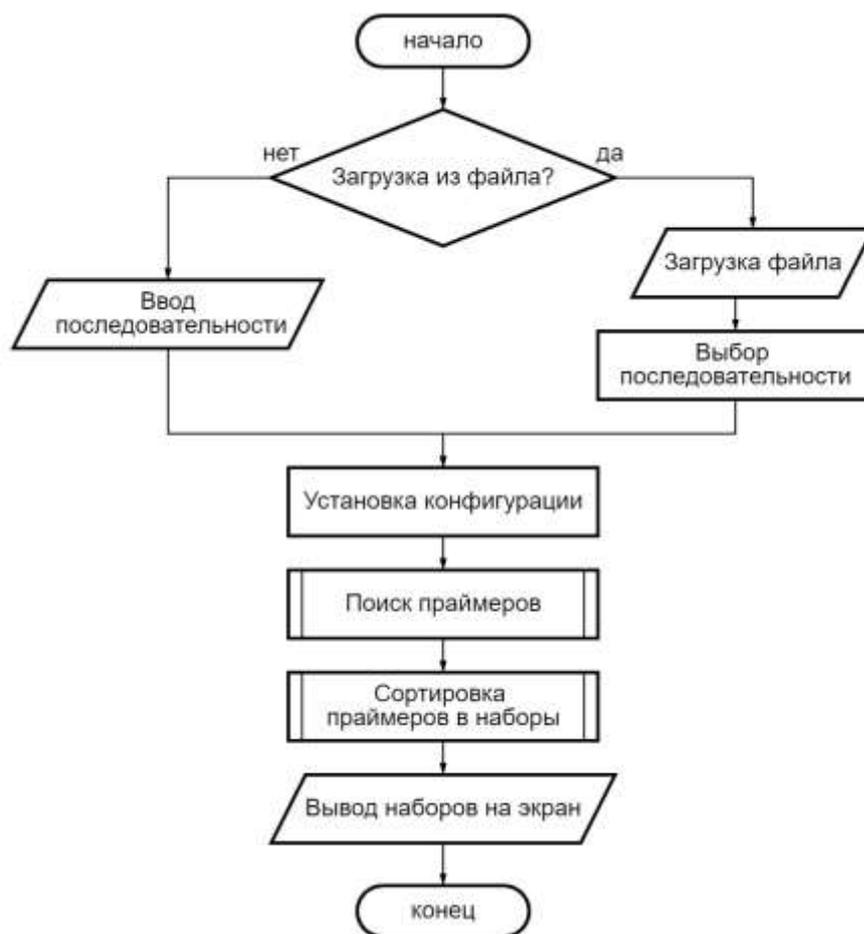


Рисунок 27 - Блок-схема дизайна комплектов LAMP-праймеров

### 3.5. Компьютерные программы дизайна LAMP-праймеров

Компьютерные программы дизайна праймеров для LAMP-амплификации были реализованы на основе вышеописанного алгоритма, на высокоуровневом языке программирования Python с использованием библиотеки biopython или на широко используемом языке программирования общего назначения C++.

#### 3.5.1. LAMPprimers iQ и LAMPprimers iQ\_loop

Программа LAMPprimers iQ предназначена для подбора комплекта из четырех праймеров для классической LAMP. Она реализована на языке программирования Python с использованием библиотеки biopython,

зарегистрирована в Реестре программ для ЭВМ под названием LAMPprimers iQ (№ 2022617417 от 20.04.2022 г.). Код программы доступен по ссылке:

[https://github.com/Restily/LAMPprimers-iQ/blob/main/lamp/start\\_lamp.py](https://github.com/Restily/LAMPprimers-iQ/blob/main/lamp/start_lamp.py).

Программа LAMPprimers iQ\_loop предназначена для подбора шести LAMP-праймеров (включая петлевые). Она также реализована на языке программирования Python с использованием библиотеки biopython, зарегистрирована в Реестре программ для ЭВМ под названием LAMPprimers iQ-loop (№ 2023662840 от 14.06.2023 г.).

Программы LAMPprimers iQ и LAMPprimers iQ-loop имеют следующие функциональные возможности:

- 1) Загрузка последовательности из файла (простой текстовый формат, формат FASTA) или через буфер обмена,
- 2) Поиск праймеров с учетом задаваемых критериев,
- 3) Объединение праймеров в наборы согласно критериям:
  - соответствие размеру мишени;
  - соответствие расстоянию между праймерами;
  - соответствие заданной  $\Delta T_m$ ;
  - исключение гомо- и гетеродимеров.
- 4) Вывод наборов праймеров на экран и/или сохранение в файл (\*.xls).

Программа LAMPprimers iQ обладает дружелюбным и интуитивно понятным интерфейсом (рисунок 28), разработанным с использованием набора инструментов framework Qt. В стартовом окне программы приводится инструкция для пользователя на английском языке и основные параметры поиска праймеров, а также 3 кнопки:

- 1) Open File (Открыть файл).
- 2) Paste Sequence (Вставить последовательность).
- 3) Primer Design Parameters (Параметры для дизайна праймеров).

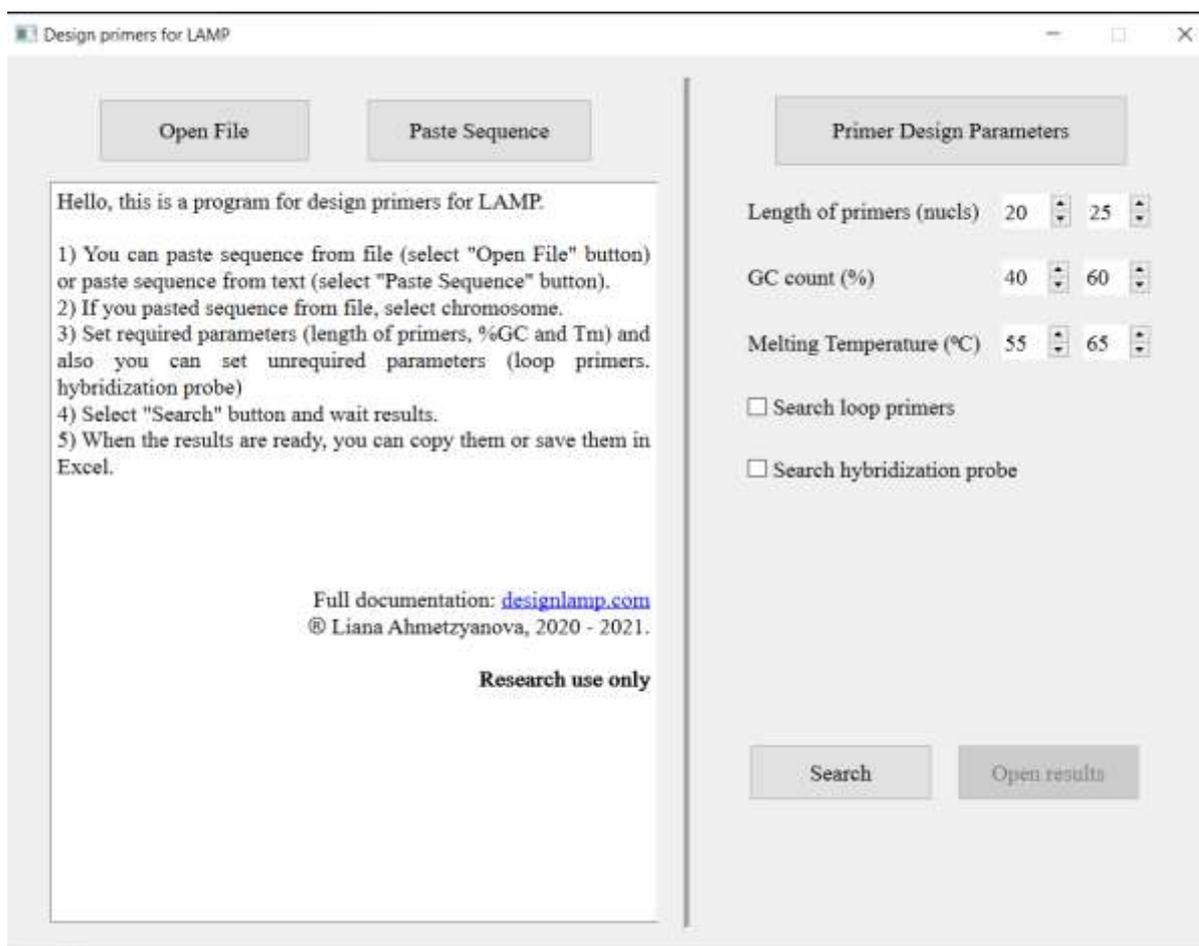


Рисунок 28 - Интерфейс программы LAMPprimers iQ (стартовое окно)

При нажатии кнопки «Paste Sequence» появляется окно, в которое необходимо вставить последовательность для поиска в ней наборов праймеров. При нажатии на кнопку «Open File» выходит диалоговое окно с выбором файла для открытия, далее файл систематизирует информацию, и записи из этого файла выводятся в виде списка. Любую запись из этого файла можно выбрать для поиска наборов праймеров на ней. При нажатии на «Primer Design Parameters» открывается окно (рисунок 29), где возможно изменять параметры дизайна праймеров. Наилучшие значения установлены по умолчанию.

Distances (min, max):	
F3 - F2	1 10
F2 - F1c	10 25
F1c - B1c	0 30
B2 - B1c	10 25
B3 - B2	1 10
Amplicon length	120 220
Length ( $\Delta$ max)	3
Na <sup>+</sup> concentration	0.05
Tm ( $\Delta$ max)	2.00
<input type="button" value="Save"/> <input type="button" value="Cancel"/>	

Рисунок 29 - Окно задания параметров дизайна праймеров

После выбора записи в файле, либо вставки последовательности, при нажатии на кнопку «Search» происходит дизайн праймеров. Далее, если удалось подобрать праймеры согласно заданным параметрам, можно открыть найденные наборы для просмотра при нажатии на кнопку «Open Results» (рисунок 30). Все праймеры обозначаются разными цветами для более легкого зрительного восприятия. Также указываются координаты праймеров, их длина, GC-состав и температура отжига. В верхней части экрана, передвигая курсор, можно визуально оценить расположение праймеров в одном наборе относительно друг друга. Текущий, либо все найденные наборы можно сохранить в формате Excel при нажатии на кнопку «Save to Excel».

Widget

Target DNA    CTCGTCTATC TTCTGCAGGC TGCTTACGGT TTCGTCCGTG TTGCAGCCGATCATCAGCAC ATCTAGGTTT  
 Complement DNA    GAGCAGATAGAAGACGTC CGACGAATGCCA AAGCAGGCAC AACGTCGGCTAGTAGTCGTGTAGATCCAAA  
 170                    180                    190                    200                    210                    220                    230

TTCTGCAGGC TGCTTACGGT TTC
TGTTGCAGCCGATCATCAGCAC

	Primer	5'-pos	3'-pos	Length	%GC	Tm
F3	TTCTGCAGGC TGCTTACGGT TTC	181	203	23	52.17	56.29
F2	TGTTGCAGCCGATCATCAGCAC	209	230	22	54.55	56.13
F1c	CTCTCCATCTTACCTTTCGGTCAC	250	273	24	50.0	56.44
B1c	CACGTCCAACCTCAGTTTGCCGTGT	302	324	23	52.17	56.29
B2	CCAAGCCACGTACGAGCAC	341	360	20	60.0	55.75
B3	CCTCTGATAAGACCTCCTCCAC	368	389	22	54.55	56.13
FIP	CTCTCCATCTTACCTTTCGGTCAC TGTTGCAGCCGATCATCAGCAC					
BIP	CTCTCCATCTTACCTTTCGGTCAC TGTTGCAGCCGATCATCAGCAC					

Рисунок 30 - Окно результатов работы программы

В таблице 6 сравнены характеристики LAMPrimers iQ и LAMPrimers iQ\_loop со сторонними программными продуктами.

LAMPrimers iQ и LAMPrimers iQ\_loop работают таким образом, что количество выданных наборов праймеров зависит от заданных параметров поиска.

Таблица 6 - Сравнение основного функционала программ дизайна LAMP-праймеров.

Программа	Язык программирования	Длина анализируемого участка	поддержка петлевых праймеров	Графический интерфейс	Прочее
LAMPPrimer iQ (данная работа)	Python	не ограничен	-	да	Бесплатная онлайн
LAMPprimers iQ-loop (данная работа)	Python	не ограничен	+	да	Бесплатная онлайн
Primer Explorer (V4, V5) Eiken Chemical Co. LTD Япония	Java	до 2000	+	да	Бесплатная онлайн
FastPCRPrimer Digital Ltd Финляндия	Java	12-500	-	нет	Коммерческая
GLAPD Шанхайский университет Цзяо Тун, КНР	C, CUDA C, Perl	не ограничен	+	нет	Linux
LAMP DesignerPremier Biosoft, США		до 15000	+	да	Коммерческая
Lamprim	Python		-	-	Не доступен
LAVA	BioPerl		-	-	Не доступен
NEB LAMPNew England Biolabs, США	Java	100- 2000	+	да	Бесплатная онлайн

Чем строже параметры, тем меньше наборов будет найдено. Например, если указать более узкий диапазон по GC-составу, например 45-55%, уменьшить разницу  $T_m$  в одном наборе до двух, сузить длину анализируемого участка до 160 пар нуклеотидов и т.д., программа может не выдать ни одного набора (таблица 7). Таким образом, при жестких условиях подбора LAMP-праймеров генерируется наименьшее количество наборов.

Таблица 7 - Количество наборов праймеров для бактериофага Лямбда в зависимости от заданных параметров отбора.

GC, %	$\Delta T_m$ , °C	Максимальная длина амплифицируемого участка, п.н.			
		300	230	200	160
40-60	5	138	118	78	29
	2	137	113	67	25
45-55	5	89	57	30	5
	2	84	50	27	5
50-60	5	124	102	72	26
	2	123	96	62	22
55-65	5	101	69	52	17
	2	93	62	43	12

\*Приведены расчетные данные для нуклеотидной последовательности бактериофага Лямбда, полученные на ноутбуке следующей конфигурации: процессор Intel(R) Core(TM) i7-10750H CPU, 2.60GHz, 6 ядер. 16 ГБ ОЗУ.

Для относительно коротких нуклеотидных последовательностей (до 2000 п.н.) подбор праймеров занимает менее секунды. С увеличением длины последовательности продолжительность поиска праймеров увеличивается экспоненциально (рисунок 31). Очевидно, что продолжительность поиска праймеров зависит от количества подобранных наборов праймеров и мощности компьютера.

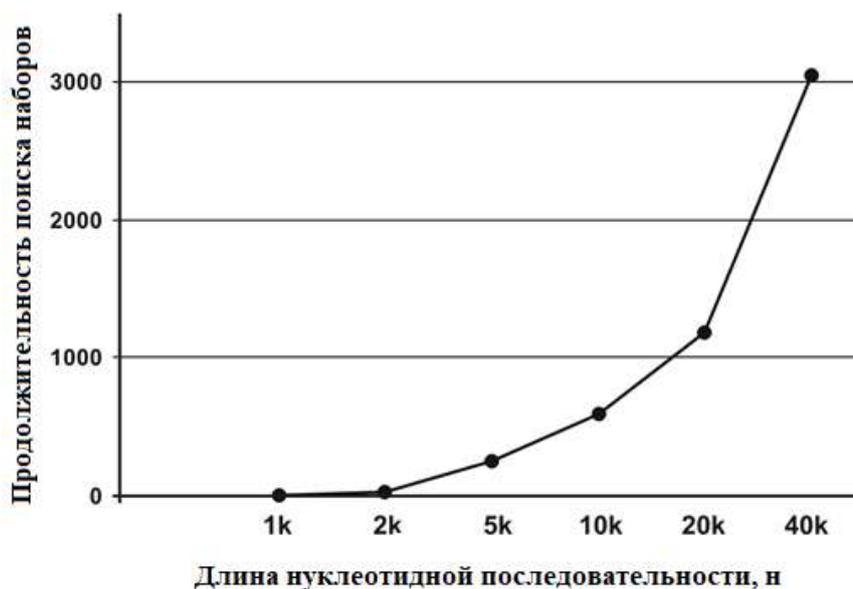


Рисунок 31- Влияние длины нуклеотидной последовательности на продолжительность подбора наборов праймеров.

### 3.5.2. Программы подбора праймеров для технологий MIP-LAMP, mirLAMP и LigLAMP

MIP-LAMP – десктопная программа реализованная на языке C++, предназначенная для автоматизированного дизайна множественных внутренних LAMP-праймеров. Программа обеспечивает высокую точность и гибкость при создании наборов праймеров, учитывая биофизические параметры, такие как GC-состав, температура отжига ( $T_m$ ), структурные требования. *далее проверить правильность текста* В алгоритме программы заложены оптимизация вычислений путем многопоточной обработки данных, динамическое распределение задач между потоками для ускорения поиска и сортировки, минимизация использования памяти за счёт освобождения ресурсов после этапов вычислений. Преимуществами программы являются ее гибкость (осуществляется поддержка произвольного количества внутренних праймеров и настройка параметров через JSON), производительность и кроссплатформенность (может быть скомпилирована под Linux, Windows и macOS).

mirLAMP – высокоспециализированный C++-инструмент для автоматизированного дизайна праймеров для детекции микроРНК методом LAMP. Программа объединяет алгоритм оптимизированного перебора для подбора геометрии праймерного набора с рандомизированной генерацией и строгой проверкой на образование димеров, что обеспечивает высокую специфичность и надёжность амплификации. Гибкость настройки позволяет исследователям легко изменять диапазоны длин праймеров, %GC, целевой температурный диапазон и другие параметры, а выходные данные в JSON-формате содержат полный отчёт о ходе вычислений и характеристики каждого сформированного набора. Алгоритм оптимизированного перебора исследует возможные комбинации длин праймеров и межпраймерных расстояний, отбирая последовательности, удовлетворяющие заданным допускам по температуре отжига и разнице длин праймеров. Это позволяет гарантировать, что каждый набор праймеров будет сбалансированным по термодинамическим характеристикам. На основе последовательности НК-мишени рандомная генерация нуклеотидных последовательностей обеспечивает подбор матриц-кандидатов. Полная последовательность ампликона конструируется путём чередования праймеров и случайных звеньев между ними. MirLAMP автоматически рассчитывает длину итогового участка и обеспечивает её попадание в заданный диапазон. Пользователь может тонко настраивать:

- диапазон длин праймеров (например, 18-22 нуклеотида),
- GC-состав (40-80 %),
- допустимый разброс температур отжига ( $\pm 1-3$  °C),
- длину межпраймерных вставок (20-200 нуклеотидов),
- ограничения на повторения нуклеотидов и димеризацию.

lig-LAMP – десктопная программа на C++, предназначенная для проектирования ДНК-шпилек, лигируемых на микроРНК, и праймеров для LAMP-амплификации мишени, образующейся при лигировании. Она автоматизирует многоступенчатый стохастический алгоритм: случайная

генерация стебля, петли и "свисающего" конца шпильки, вычисление комплементарного участка, расчёт температуры отжига соседних участков, исключение гетеро- и гомодимеров, а затем сборка FIP/BIP-праймеров, которые формируются из комплементарного стебля левой и правой шпилек и части "свисающего" конца, соответственно. Алгоритм программы обеспечивает равномерный выбор нуклеотидов А, Т, С и G для стебля и петли. Петля набирается случайно из указанного диапазона длины и вставляется между стеблем и его комплементом. "Свисающий" конец достраивается так, чтобы итоговая длина шпильки не выходила за указанные в параметрах пределы.

### **3.6. Обнаружение специфических мишеней с помощью различных вариантов LAMP**

#### *3.6.1. Экспериментальная оценка эффективности работы LAMPprimers iQ*

В 2020 г. коронавирус SARS-CoV-2 стал причиной чрезвычайной ситуации в области общественного здравоохранения во всем мире (Wang et al., 2020). Он вызывает опасную болезнь, которая получила название COVID-19. Молекулярная диагностика COVID-19 в первую очередь основана на обнаружении РНК вируса (Carter et al., 2020, Udugama et al., 2020).

Считается, что LAMP обеспечивает более высокую специфичность обнаружения мишеней за счет увеличения количества мест отжига праймеров на целевом участке. Однако известно, что чем больше праймеров участвует в реакции, тем выше вероятность образования нежелательных вторичных структур (гомо- и гетеродимеров). Такие структуры приводят к образованию неспецифических ампликонов, которые мешают специфическим продуктам LAMP (лампликонам) и снижают достоверность анализа. Было показано, что гомо- и гетеродимеры, имеющие два или более комплементарных 3'-концевых нуклеотида, приводят к эффективному накоплению продуктов димеризации во время ПЦР-амплификации

(Garafutdinov et al., 2020). Таким образом, можно сделать вывод, что дизайн LAMP праймеров должен проводиться тщательно, с учетом более строгих и жестких критериев отбора, чем для ПЦР праймеров.

В работе (Garafutdinov et al., 2017) было показано, что близость праймеров позволяет сократить продолжительность ПЦР и обеспечить надежное обнаружение специфических мишеней в образцах деградированной ДНК. ПЦР с высококачественными смежными праймерами характеризуется отсутствием неспецифических ампликонов, что обеспечивает чрезвычайную чувствительность с пределом обнаружения на уровне одной копии (Garafutdinov et al., 2015, 2020). Эти наблюдения объясняются тем, что праймеры встык полностью покрывают нуклеотидную последовательность мишени на протяжении ~40-50 п.н., в то время как каждый обычный праймер покрывает только 20-25 п.н.. Таким образом, для обеспечения высокой специфичности LAMP-анализа необходимо уменьшить расстояние между праймерами F1 и B1, F2 и F3, B2 и B3, соответственно.

Для оценки качества праймеров, подбираемых с помощью программы LAMPprimers iQ были проведены эксперименты по обнаружению генетического материала коронавируса SARS-CoV-2 в носоглоточных мазках пациентов с подозрением на COVID-19. Также были использованы экстракты носоглоточных мазков с отрицательными результатами ПЦР на SARS-CoV-2. Диагноз COVID-19 был подтвержден методом RT-ПЦР с использованием набора для выявления RT-PCR-SARS-CoV-2 («Синтол», Россия). Для исследования готовили также образцы Rmix(+) и Rmix(-) путем смешивания 10 экстрактов РНК SARS-CoV-2-позитивных пациентов объемом 30 мкл каждый.

В качестве мишени для амплификации была взята нуклеотидная последовательность S-гена коронавируса SARS-CoV-2 (фрагмент ~1000 п.н.). Для поиска праймеров были заданы стандартные параметры (при GC 40-60%,  $\Delta T_m = 5$ , длина области амплификации до 300 п.н.). К одному и тому же участку РНК подбирались наборы праймеров с помощью программы

LAMPrimers iQ, онлайн-доступной программы компании New England Biolabs NEB LAMP Primer Design и еще одного ПО PrimerExplorer.

Положительные образцы с праймерами, полученными с помощью NEB LAMP Primer Design, показали наиболее ранний подъем кривых амплификации (N+), что свидетельствует о быстром накоплении продуктов LAMP (рисунок 32). Отрицательные образцы также имеют небольшие значения порогового цикла T<sub>t</sub>, что свидетельствует о неспецифичности данного набора праймеров (N-).

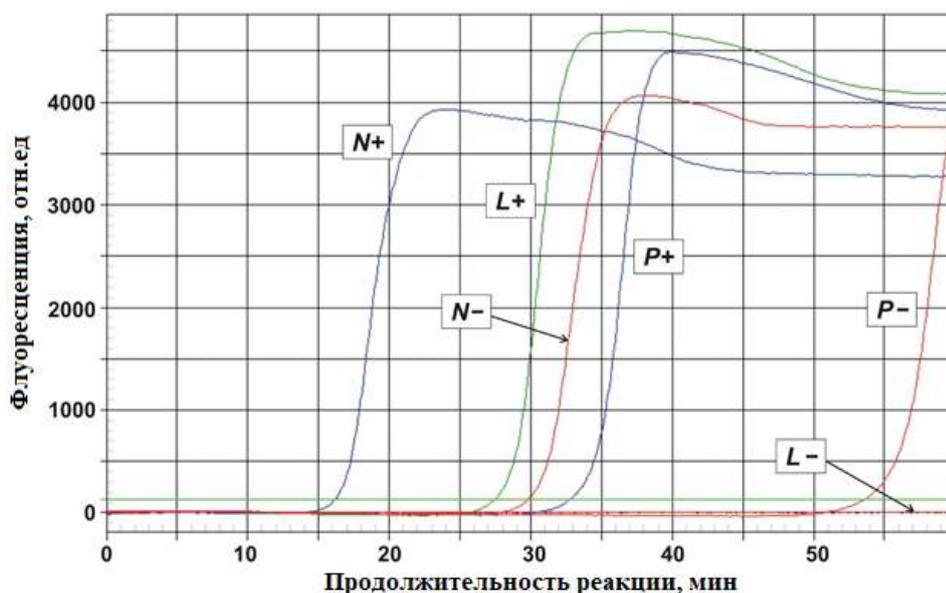


Рисунок 32 - Результаты для наборов праймеров, отобранных с помощью: L - LAMPrimers iQ (набор 'L'), N - NEB LAMP Primer Design ('N') и P - PrimerExplorer ('P'), соответственно; «+» образцы содержали РНК коронавируса SARS-CoV-2 (использовался образец Rmix(+)), «-» - контроль (использовался образец Rmix(-))

Праймеры, полученные с помощью PrimerExplorer, показали самый поздний подъем кривых амплификации (P+) и более поздний подъем неспецифической LAMP (P-) по сравнению с NEB LAMP (N+) и LAMPrimers iQ (L+). Праймеры, полученные с помощью LAMPrimers iQ так же обеспечивали более поздний подъем кривых амплификации (L+) по сравнению с NEB LAMP (N+). Однако образцы, не содержащие РНК вируса (L-) не показали никаких подъёмов даже после 50 минут, тем самым

обеспечивая самую высокую надежность обнаружения вирусной РНК. Таким образом, комплекты праймеров, подобранные с помощью сторонних программных средств, не обеспечили надежное выявление вирусной РНК. В свою очередь праймеры, подобранные с помощью разработанного комплекса LAMPrimer iQ, оказались более специфичными.

Применимость праймеров, подобранных с помощью LAMPrimers iQ, для выявления патогенной РНК была оценена на выборке клинических образцов (N=25), полученных от больных с подтвержденным с помощью ПЦР диагнозом COVID-19. На рисунке 33 представлены кривые амплификации, полученные при детекции РНК коронавируса SARS-CoV-2 с использованием праймеров набора LAMPrimers iQ.

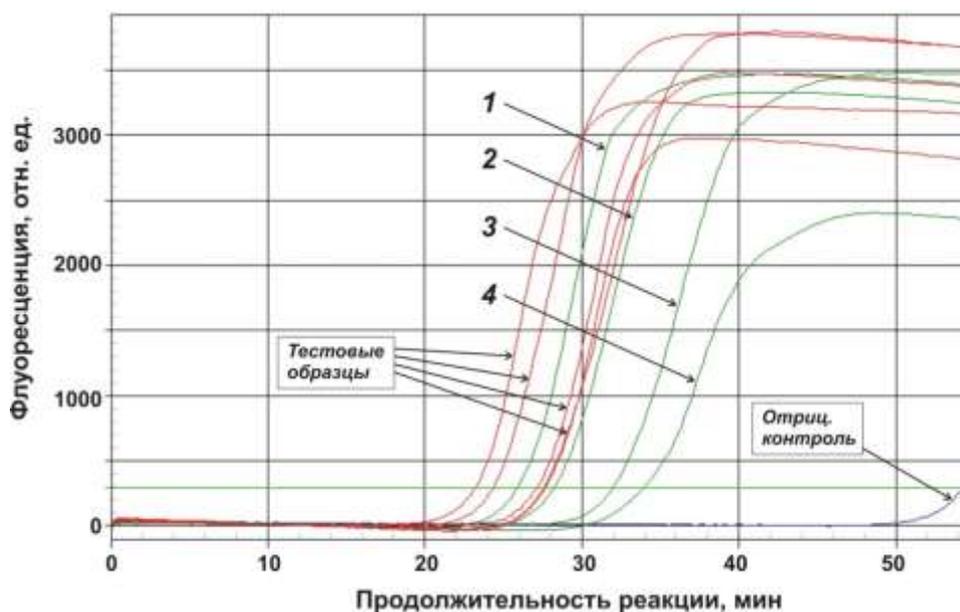


Рисунок 33 - Результаты, полученные для праймеров 'L'. Кривые 1-4 соответствуют разведениям образца Rmix(+) (зеленый): 1 - без разбавления, 2 - 10-кратное, 3 - 100-кратное и 4 - 1000-кратное разбавления. Тестовые образцы (красный): образцы, содержащие индивидуальные лизаты назофарингеальных мазков пациентов с COVID-19 (в качестве примера приведены кривые, соответствующие пяти пациентам). NTC (синий): отрицательный контроль - образец, не содержащий нуклеиновых кислот

На приведенном рисунке 33 красным цветом выделены кривые, соответствующие пяти индивидуальным клиническим образцам. Путем

смешивания этих пяти образцов получали микс, который затем серийно разбавляли в 10, 100 и 1000 раз. Соответствующие этим разбавлениям образцы положительного контроля использовали для оценки чувствительности реакции, а полученные кривые амплификации показаны на рисунке зеленым цветом. Образцы от больных COVID-19 показали ранний подъем кривых амплификации (в диапазоне 20-30 мин от начала реакции). Разница в величинах порогового времени для данных образцов было обусловлено различием в количестве РНК-мишеней (вирусной нагрузки). Необходимо иметь в виду, что вирусная нагрузка выше у пациентов, которые болеют сильнее и концентрации вируса в образце будет выше, следовательно, кривые будут иметь более ранние подъёмы. Оказалось, что даже при невысоком содержании генетического материала коронавируса праймеры, подобранные с помощью LAMPprimers iQ, позволяют достоверно обнаруживать генетический материал патогена

В таблице 8 приведены данные сравнения порогового цикла (Ct) ПЦР и порогового времени (Tt) LAMP. Анализ данных, полученных при амплификации всех образцов, включая SARS-CoV-2-сомнительные (N=10) и SARS-CoV-2-отрицательные (N=10), показал возможность дифференциации их от SARS-CoV-2-положительных образцов. Так, значения Tt для SARS-CoV-2-положительных образцов находились в пределах 20-30 мин, в то же время для образцов из остальных групп значения Tt превышали 50 мин, что свидетельствует об отсутствии в них вирусной ДНК. Полученные значения Tt хорошо коррелируют со значениями Ct, уже с известными данными ПЦР-тестирования. Диапазоны значений Tt для SARS-CoV-2-положительных образцов и образцов, не содержавших РНК-мишень, не перекрывались, т.е., это позволяет различать эти типы образцов и с высокой достоверностью выявлять патогенную РНК (Garafutdinov et al., 2020, Sakhabutdinova et al., 2020). Результаты LAMP с сомнительными результатами ПЦР имеет отрицательные результаты.

Таблица 8 - Результаты ПЦР- и LAMP-тестов (средние значения порогового цикла (Ct) и порогового времени (Tt)) для пациентов с подозрением на COVID-19.

Образец	Данные	Данные	состояние*	Образец	Данные	Данные	состояние	Образец	Данные	Данные	состояние
	ПЦР	LAMP			ПЦР	LAMP			ПЦР	LAMP	
	Ct	Tt, мин			Ct	Tt, мин			Ct	Tt, мин	
# 1**	27	21	+	# 16	29	25	+	# 31	40	59	сомнит.
# 2**	25	20	+	# 17	30	26	+	# 32	40	54	сомнит.
# 3**	31	23	+	# 18	28	34	+	# 33	40	56	сомнит.
# 4**	28	22	+	# 19	26	29	+	# 34	41	50	сомнит.
# 5**	33	23	+	# 20	24	23	+	# 35	39	57	сомнит.
# 6	32	29	+	# 21	28	26	+	# 36	49	>60	-
# 7	24	22	+	# 22	31	23	+	# 37	44	55	-
# 8	37	30	+	# 23	27	27	+	# 38	46	53	-
# 9	26	27	+	# 24	32	35	+	# 39	51	>60	-
# 10	25	21	+	# 25	26	24	+	# 40	48	55	-
# 11	32	27	+	# 26	40	54	сомнит.	# 41	43	>60	-
# 12	30	27	+	# 27	40	59	сомнит.	# 42	45	>60	-
# 13	34	29	+	# 28	40	>60	сомнит.	# 43	48	>60	-
# 14	31	26	+	# 29	41	>60	сомнит.	# 44	44	58	-
# 15	28	21	+	# 30	39	58	сомнит.	# 45	59	>60	-

\*SARS-CoV-2-положительные (+), SARS-CoV-2-отрицательные (-) пациенты или лица с сомнительными результатами ПЦР-анализа.

\*\* образцы, использованные для приготовления Rmi

### 3.6.2. Экспериментальная оценка эффективности работы MIP-LAMP

Оценку качества праймеров, подбираемых с помощью программы MIP-LAMP, проводили на примере сравнительной амплификации кДНК вируса рvУ. Соответствующие образцы содержали либо один, либо два праймера VIP вместе с одним праймером FIP. На рисунке 34 показано, что наличие двух праймеров VIP приводит к повышению скорости накопления продуктов реакции. Однако при этом происходит некоторое снижение специфичности, что можно наблюдать по поднимающимся кривым образцов отрицательного контроля.

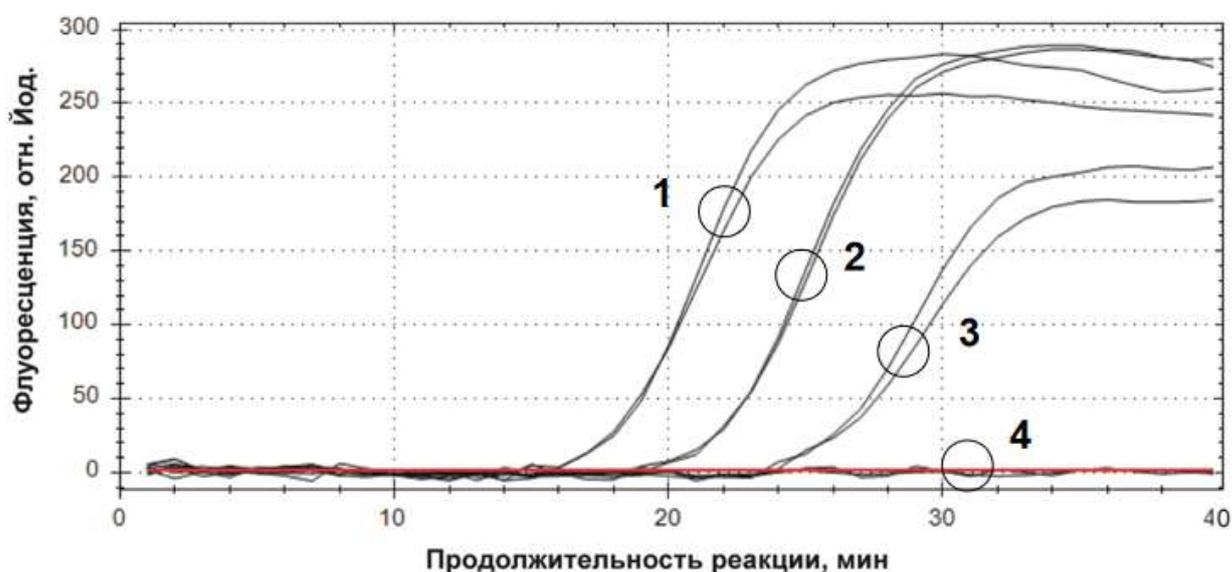


Рисунок 34 - Кривые амплификации, полученные при LAMP-амплификации кДНК вируса рvУ с использованием праймеров, подобранных программой MIP-LAMP: Образцы 1 – один праймер FIP + два праймера VIP + кДНК вируса рvУ; Образцы 2 – один праймер FIP + один праймер VIP + кДНК вируса рvУ; Образцы 3 – один праймер FIP + два праймера VIP без кДНК вируса рvУ; Образцы 4 – один праймер FIP + один праймер VIP без кДНК вируса рvУ

### 3.6.3. Экспериментальная оценка эффективности работы LigLAMP и mirLAMP

Отработку технологии ligLAMP также проводили на примере микроРНК-159 мягкой пшеницы. Тестировали два варианта получения dmb-пробы: с помощью T4 ДНК лигазы и лигазы Splint(R). Последняя

рекомендуется для лигирования цепей ДНК на РНК-матрице, однако она менее доступна, поэтому оценивали применимость ДНК-лигазы T4. Показано (рисунок 35), что ее можно использовать для этой цели, однако эффективность реакции для соответствующих образцов в этом случае все же ниже, чем при использовании лигазы SplintR.

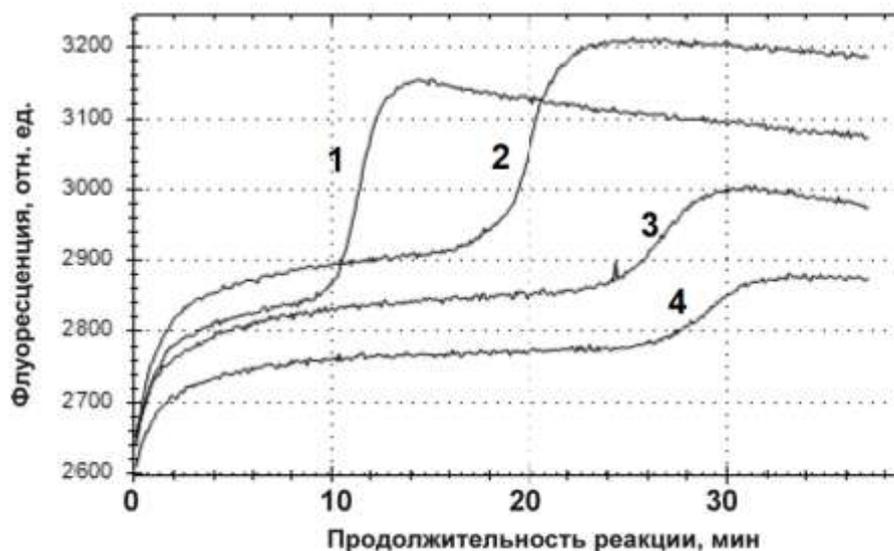


Рисунок 35 - Кривые амплификации, полученные при LAMP-амплификации образцов, полученных лигированием проб HP-R и HP-L на Тае-mir-159 с использованием праймеров, подобранных программой ligLAMP:

Образец 1 – лигаза Splint(R) + Тае-mir-159; Образец 2 – ДНК-лигаза T4 + Тае-mir-159; Образец 3 – лигаза Splint(R) без Тае-mir-159; Образец 4 – ДНК-лигаза T4 без Тае-mir-159

Отработку технологии mirLAMP проводили на примере микроРНК-159 мягкой пшеницы. В этом случае показана возможность успешного обнаружения мишени, однако требуется тщательный дизайн специальной ДНК-матрицы и кропотливая работа по оптимизации условий анализа, поскольку возможно протекание реакции и в отсутствие мишени (рисунок 36).

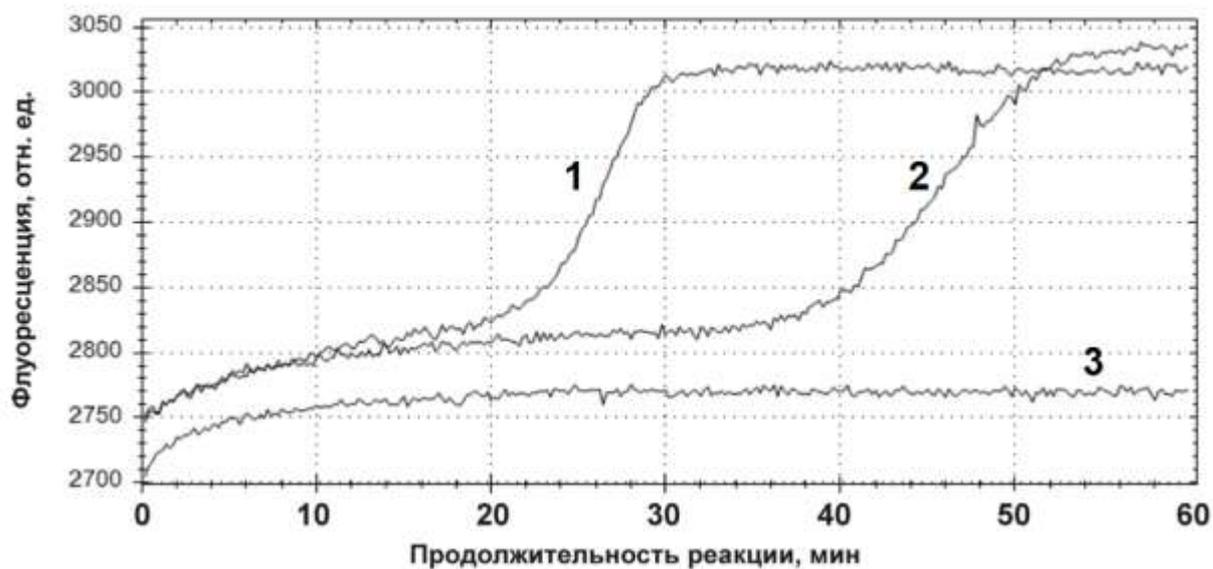


Рисунок 36 - Кривые амплификации, полученные при LAMP-амплификации пробы к миРНК-159 пшеницы *T.aestivum* L. с использованием праймеров, подобранных программой mirLAMP: Образец 1 – присутствие праймеров FIP и VIP + *Tae-mir-159* ( $10^8$  копий мишени); Образец 2 – присутствие праймеров FIP и VIP без *Tae-mir-159*; Образец 3 – отсутствие праймеров FIP и VIP + *Tae-mir-159* ( $10^8$  копий мишени)

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Амплификация нуклеиновых кислот широко используется для анализа биологических образцов с целью обнаружения в них специфических ДНК или РНК. Хотя наиболее востребованным методом остается полимеразная цепная реакция (ПЦР), все большее распространение получают методы изотермической амплификации. В свою очередь, среди последних наиболее популярной является петлевая изотермическая амплификация (LAMP). Для проведения LAMP нужно как минимум четыре праймера: два внешних и два внутренних. Из-за увеличенного числа праймеров и их особого устройства даже стандартная LAMP протекает намного сложнее, чем классическая ПЦР. Сложность структуры лампликонов и несовершенная система их наименования затрудняют создание новых вариантов LAMP и разработку программ для подбора праймеров. Для ПЦР существует множество программ, а для LAMP их всего около десяти, и они ограничены в анализе длинных последовательностей и расширении возможностей реакции

Целью данной работы стало изучение LAMP, разработка новых вариантов этой реакции и создание программ для дизайна LAMP-праймеров. На первом этапе была пересмотрена номенклатура зон мишени и праймеров, используя буквенные обозначения для упрощения анализа. Было предложено использовать заглавные буквы для зон мишени и строчные для комплементарных зон, что позволило детально описать структуру праймеров и лампликонов. В ходе LAMP возможно образование 10 типов продуктов: четыре промежуточных, два тупиковых и четыре побочных. После формирования стартовой гантелеподобной структуры начинается экспоненциальная фаза, в ходе которой образуются промежуточные и тупиковые лампликоны, а также удлиненные шпильчатые структуры, способствующие дальнейшему росту цепей ДНК.

Предложен новый метод – "псевдо-полувлоченная" LAMP (MIP-LAMP), обеспечивающий более высокий уровень размножения ДНК с

добавлением всего двух мест отжига, что не увеличивает длину мишени. Также предложены два подхода для обнаружения микроРНК с помощью LAMP: mirLAMP и ligLAMP. mirLAMP использует специальную ДНК-матрицу с последовательностью, гомологичной микроРНК, и комплементарной ей на 3'-конце. ligLAMP использует олигонуклеотидные пробы HP-L и HP-R, комплементарные микроРНК, которые лигируются при её наличии, образуя гантелеобразную структуру для запуска LAMP-циклов.

Для разработки специализированных программ для дизайна олигонуклеотидных матриц и праймеров определены критерии: длина зон (15–30 нт для внешних, 30–50 нт для внутренних), GC-состав (40–60%), оптимальная температура отжига (55–65°C), сближенное расположение зон, исключение 3'-концевых гомо- и гетеродимеров (более 2 нуклеотидов) и повторяющихся нуклеотидов (>4). Разработан алгоритм поиска праймеров для пяти новых программ. Базовой стала программа LAMPprimers iQ, написанная на языке программирования Python.

LAMP-эксперименты, направленные на обнаружение генетического материала коронавируса SARS-CoV-2 и вируса картофеля Y, показали высокую специфичность праймеров, подобранных с помощью программы LAMPprimers iQ. Данные праймеры обеспечили отсутствие амплификации в образцах отрицательного контроля и достоверное обнаружение генетического материала патогена даже при низком содержании последнего. Тестирование MIP-LAMP проводилось на примере кДНК вируса Y картофеля, продемонстрирована возможность обнаружения НК-материала с помощью LAMP. Использование двух праймеров VIP ускоряют накопление продуктов, но снижают специфичность. Для технологии mirLAMP и ligLAMP показано успешное обнаружение микроРНК при оптимизации условий анализа и возможность применения T4 ДНК-лигазы.

## ВЫВОДЫ

1. Предложена новая система обозначений зон отжига LAMP-праймеров, основанная на использовании букв латинского алфавита, регистр которых отображает комплементарность соответствующих зон нуклеотидной последовательности. Разработанная система значительно облегчает понимание структуры LAMP-праймеров и лампликонов и обеспечивает более точный подбор праймерных систем, особенно для нетрадиционных вариантов реакции.
2. Удлинение ДНК-цепей происходит в пределах одного LAMP-цикла и описывается уравнением  $Z_i = 2Z_{i-1} - 3$ . Помимо основного LAMP-цикла  $Z_6 \rightarrow Z_9 \rightarrow Z_6$ , при протекании LAMP-реакции на ее дальнейших стадиях реализуются LAMP-циклы большего размера ( $Z_9 \rightarrow Z_{15} \rightarrow Z_9$ ,  $Z_{15} \rightarrow Z_{27} \rightarrow Z_{15} \dots$ ).
3. Предложены три новых варианта реакции LAMP и смоделированы соответствующие молекулярные системы, пригодные для обнаружения специфических НК-мишеней: ligLAMP и mirLAMP для обнаружения микроРНК и MIP-LAMP для обнаружения любых НК-мишеней с увеличенной скоростью анализа.
4. Оптимизированы критерии и алгоритм подбора специфичных LAMP-праймеров, включающие новую математическую модель расчета температуры отжига праймеров, подразумевающие задание более жестких критериев их отбора и возможность сближения зон отжига.
5. Разработано пять компьютерных программ дизайна LAMP-праймеров для разных вариантов реакции. Тестирование функционала показало высокую скорость и гибкость выполнения задач при различных параметрах.
6. Показана принципиальная возможность обнаружения специфических НК-мишеней с помощью праймеров, сконструированных разработанными компьютерными программами.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алгоритм Ахо-Корасик (Электронный ресурс). – URL: [https://e-maxx.ru/algo/aho\\_corasick](https://e-maxx.ru/algo/aho_corasick) (дата обращения: 30.09.2020).
2. Алгоритм Ахо-Корасик (Электронный ресурс). – URL: [https://neerc.ifmo.ru/wiki/index.php?title=Алгоритм\\_Ахо-Корасик](https://neerc.ifmo.ru/wiki/index.php?title=Алгоритм_Ахо-Корасик) (дата обращения: 10.11.2020).
3. Бактериофаг Лямбда как модельный объект в генетических исследованиях (Электронный ресурс). – URL: <https://scienceforum.ru/2018/article/2018002259> (дата обращения: 21.04.2021).
4. Бодулев, О.Л. Изотермические методы амплификации нуклеиновых кислот и их применение в биоанализе / О.Л. Бодулев, И.Ю. Сахаров // Биохимия. – 2020. – Т. 85(2). – С. 174-196.
5. Боровский, А. Алгоритм поиска в тексте / А Боровский (Электронный ресурс). – URL: <https://rsdn.org/article/alg/textsearch.xml> (дата обращения: 20.03.2021).
6. Введение в Python. (Электронный ресурс). – URL: <https://developers.google.com/edu/python/introduction?hl=ru> (дата обращения: 20.08.2021).
7. Гарафутдинов, Р.Р. Разнообразие праймеров для ПЦР и принципы их подбора / Р.Р. Гарафутдинов, Ан.Х. Баймиев, Г.В. Малеев, Я.И. Алексеев, В.В. Зубов, Д.А. Чемерис, О.Ю. Кирьянова, И.М. Губайдуллин, Р.Т. Матниязов, А.Р. Сахабутдинова, Ю.М. Никоноров, Б.Р. Кулуев, Ал.Х. Баймиев, А.В. Чемерис // Биомика. – 2019. – Т.11(1). – С. 23-70.
8. Зырина, Н.В. Неспецифический синтез нуклеиновых кислот в реакциях изотермической амплификации / Н.В. Зырина, В.Н. Антипова // Биохимия. - 2021. - Т. 86(7). - С. 10661077.

9. Ибремпашаев, Т. Упрощенный алгоритм Бойера-Мура / Т. Ибремпашаев (Электронный ресурс). – URL: <https://habr.com/ru/post/116725/> (доступно 28.03.2021).
10. Инютин, С. А. Модульная арифметика / С. А. Инютин // Большая российская энциклопедия 2004–2017 (Электронный ресурс). – URL: <https://old.bigenc.ru/mathematics/text/3954960> (дата обращения: 15.04.2021).
11. Кабанихин, С.И. Обратные и некорректные задачи. Учебник для студентов высших учебных заведений / С.И. Кабанихин. – 4-е изд. – Новосибирск: Сибирское отделение РАН, 2018. – 508 с.
12. Кирьянова, О.Ю. Алгоритмы поиска в задачах анализа нуклеотидных последовательностей с целью однозначной идентификации геномов / О.Ю. Кирьянова, Л.У. Ахметзянова, И.М. Губайдуллин // Вестник Башкирск. ун-та. – 2020. – Т. 25(2). – С. 285-290.
13. Кормен, Т. Алгоритмы: построение и анализ / Т. Кормен, Ч. Лейзерсон, Р. Ривест, К. Штайн. 2-е изд., пер. с англ. – М.: И.Д. Вильямс, 2011. – 1296 с.
14. Лысенко, Е.А. Современные методы молекулярной биологии: Полимеразная цепная реакция / Е.А.Лысенко // Стратегия подбора праймеров для анализа экспрессии генов. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний. – 2011. – С. 75-96.
15. Модуль itertools (Электронный ресурс). – URL: Модуль itertools | Python 3 для начинающих и чайников (pythonworld.ru) (дата обращения: 21.04.2021).
16. Описание формата FASTA для последовательностей белков и нуклеиновых кислот (Электронный ресурс). – URL: [Fasta format \(msu.ru\)](https://www.msuden.com/FASTA-format/) (дата обращения: 30.01.2020).
17. Петруша, О.А. Методы детекции результатов петлевой изотермической амплификации ДНК / О.А. Петруша, Е.Б. Файзулов // Клиническая лабораторная диагностика. – 2020. – Т.65(1). – С.67-72.

18. Программа GLAPD. (Электронный ресурс). – URL: <https://github.com/jiqingxiaoxi/GLAPD> (дата обращения: 25.02.2021).
19. СИНТОЛ. Научно-производственная компания (Электронный ресурс). – URL: <https://www.syntol.ru/> (дата обращения: 21.07.2022).
20. Смит, Б. Методы и алгоритмы вычислений на строках / Б. Смит. – М.: И.Д. Вильямс, 2006. – 496 с.
21. Строковые алгоритмы на практике. Часть 3 - Алгоритм Рабина-Карпа (Электронный ресурс). – URL: <https://habr.com/ru/articles/662678/> (дата обращения: 22.03.2021).
22. Федоров, Д. Ю. Программирование на языке высокого уровня Python: учеб. пособие для прикладного бакалавриата / Д. Ю. Федоров. – 2-е изд. – М.: Издательство Юрайт, 2019. – 161 с.
23. Фермент рестрикции – Restriction enzyme Фермент рестрикции. (Электронный ресурс). – URL: [https://dev.abcdef.wiki/wiki/Restriction\\_enzyme](https://dev.abcdef.wiki/wiki/Restriction_enzyme) (дата обращения: 20.01.2021).
24. Хеш-функция, что это такое? <https://habr.com/ru/articles/534596/> (дата обращения: 20.03.2021).
25. Чемерис Д.А. Дизайн праймеров для полимеразной цепной реакции (краткий обзор компьютерных программ и баз данных) / Д.А. Чемерис, О.Ю. Кирьянова, И.М. Губайдуллин, А.В. Чемерис // Биомика. – 2016. – Т. 8(3). – С. 215-38. (Электронный ресурс). – URL: <https://biomicsj.ru/upload/iblock/b05/3.pdf>.
26. Яркова, О.Н. Математические методы и модели исследования операций / О.Н. Яркова, А.В. Раменская, А.Г. Реннер, О.С. Чудинова. – Оренбург: Оренбургский гос. ун-т, 2021. – 296 с.
27. Aggarwal, K. Hash\_RC6 – Variable length Hash algorithm using RC6 / K. Aggarwal, H. K. Verma // International Conference on Advances in Computer Engineering and Applications. Ghaziabad. India. – 2015. – P. 450-456.

28. Aho, A.V. Efficient string matching: An aid to bibliographic search / A.V. Aho, M.J. Corasick // *Commun. ACM.* – 1975. – V. 18(6). – P. 333-340.
29. Ahsan, A. Molecular diagnostic assays for the detection of peste des petits ruminants virus: a concise review / A. Ahsan, M. Usman, I. Ullah, A.B. Zahur, A.R. Malik // *Vet. Sci.: Res. Rev.* - 2017. - V. 3(3). - P. 53-57.
30. Akhmetzianova, L.U. LAMPprimers iQ: New primer design software for loop-mediated isothermal amplification (LAMP) / L.U. Akhmetzianova, T.M. Davletkulov, A.R. Sakhabutdinova, A.V. Chemeris, I.M. Gubaydullin, R.R. Garafutdinov // *Anal. Biochem.* – 2023. —№ 2. – P. 115376.
31. Akhmetzianova, L.U. Parallel implementation of the primer search algorithm for loop-mediated isothermal amplification / L.U. Akhmetzianova, T.M. Davletkulov, I.M. Gubaidullin, A.R. Islamgulov // *J. Phys.: Conf. Ser.* – 2021. – V. 2131(2). – P. 022004.
32. Arabi-Jeshvaghani, F. LAMPPrimerBank, a manually curated database of experimentally validated loop-mediated isothermal amplification primers for detection of respiratory pathogens / F. Arabi-Jeshvaghani, F. Javadi-Zarnaghi, H.F. Löchel, R. Martin, D. Heider // *Infection.* – 2023. – V. 51(6). – P.1809-1818.
33. Atkinson, K. E. *Elementary Numerical Analysis* / K. E. Atkinson, W. Han – 3rd Edition. Wiley, 2003. – 576 p.
34. Baek, Y.H. Development of a reverse transcription-loopmediated isothermal amplification as a rapid earlydetection method for novel SARS-CoV-2 / Y.H. Baek, J. Um, K.J.C. Antigua, J.H. Park, Y. Kim, S. Oh, Y.I. Kim, W.S. Choi, S.G. Kim, J.H. Jeong, B.S. Chin, H.D.G. Nicolas, J.Y. Ahn, K.S. Shin, Y.K. Choi, J.S. Park, M.S. Song // *Emerg Microbes Infect.* - 2020. – P.998-1007.
35. Bayer, P.E. Assembly and comparison of two closely related Brassica napus genomes // P.E. Bayer, B. Hurgobin, A.A. Golicz, C.K. Chan, Y. Yuan, H. Lee, M. Renton, J. Meng, R. Li, Y. Long, J. Zou, I. Bancroft, B. Chalhoub,

- G.J. King, J. Batley, D. Edwards // *Plant Biotechnol. J.* – 2017 – V. 15(12). – P.1602-1610.
36. Bayer, P.E. Sequencing the USDA core soybean collection reveals gene loss during domestication and breeding / P.E. Bayer, B. Valliyodan, H. Hu, J.I. Marsh, Y. Yuan, T.D. Vuong, G. Patil, Q. Song, J. Batley, R.K. Varshney, H.M. Lam, D. Edwards, H.T. Nguyen // *Plant Genome.* – 2022 – V. 15(1). – P.e20109.
37. Becherer, L. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) – review and classification of methods for sequence-specific detection / L. Becherer, N. Borst, M. Bakheit, S. Frischmann, R. Zengerle, F.von Stetten // *Anal. Methods.* – 2020. – V.12 (6). – P.717-746.
38. Bektaş, A. Loop-mediated isothermal amplification of single pollen grains / A. Bektaş, I. Chapela // *J. Integr. Plant Biol.* - 2014. - V. 56(8). - P.741-748.
39. Bendifallah, S. Salivary MicroRNA signature for diagnosis of endometriosis / S. Bendifallah, S. Suisse, A. Puchar, L. Delbos, M. Poilblanc, P. Descamps, F. Golfier, L. Jornea, D. Bouteiller, C. Touboul, Y. Dabi, E. Daraï. // *J. Clin. Med.* –2022. – V. 11 (3). – P.612.
40. Biopython. (Электронный ресурс). – URL: <https://biopython.org/> (дата обращения: 20.04.2021).
41. Biswas, G. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for detection and identification of aquaculture pathogens: current state and perspectives / G. Biswas, M. Sakai // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2014. – V. 98(7). – P. 2881-2895.
42. Cao, J. Whole-genome sequencing of multiple *Arabidopsis thaliana* populations / J. Cao, K. Schneeberger, S. Ossowski, T. Günther, S. Bender, J. Fitz, D. Koenig, C. Lanz, O. Stegle, C. Lippert, X. Wang, F. Ott, J. Müller, C. Alonso-Blanco, K. Borgwardt, K.J. Schmid, D. Weigel // *Nat. Genet.* – 2011. – V. 43(10). – P.956-963.

43. Carter, L.J. Assay techniques and test development for COVID-19 diagnosis / L.J. Carter, L.V. Garner, J.W. Smoot, Y. Li, Q. Zhou, et al // ACS Cent. Sci. – 2020. – V. 6(5). – P. 591-605.
44. Chemeris, A.V. How to avoid the appearance of falsepositive results in a polymerase chain reaction? / A.V. Chemeris, E.G. Magdanov, R.R. Garafutdinov, V.A. Vakhitov, Yu.A. Ovchinnikov // Bulletin of Biotechnology and Physical and Chemical Biology. - 2012. - V. 8(3). - P. 34-45.
45. Chen, C. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR / C. Chen, D.A. Ridzon, A.J. Broomer, Z. Zhou, D.H. Lee, J.T. Nguyen, M. Barbisin, N.L. Xu, V.R. Mahuvakar, M.R. Andersen, K.Q. Lao, K.J. Livak, K.J. Guegler // Nucleic. Acids. Res. – 2005. – V. 33(20). – P.e179.
46. Chen, J. Pangenome analysis reveals genomic variations associated with domestication traits in broomcorn millet / J. Chen, Y. Liu, M. Liu, W. Guo, Y. Wang, Q. He, et al. // Nat. Genet. – 2023. – V.55(12). – P.2243-2254.
47. Chen, S. Gene mining and genomics-assisted breeding empowered by the pangenome of tea plant *Camellia sinensis* / S. Chen, P. Wang, W. Kong, K. Chai, S. Zhang, J. Yu, Y. Wang, M. Jiang, W. Lei, X. Chen, W. Wang, Y. Gao, S. Qu, F. Wang, Y. Wang, Q. Zhang, M. Gu, K. Fang, C. Ma, W. Sun, N. Ye, H. Wu, X. Zhang // Nat Plants. – 2023 – V. 9(12). – P. 1986-1999.
48. Chen, S.H. Primer Design Assistant (PDA): A web-based primer design tool / S.H. Chen, C.Y. Lin, C.S. Cho, C.Z. Lo, C.A. Hsiung // Nucleic Acids Res. – 2003. – V. 31. – P. 3751-3754.
49. Chen, Y. A Point-of-Care Nucleic Acid Quantification Method by Counting Light Spots Formed by LAMP Amplicons on a Paper Membrane / Y. Chen, Y. Zhu, C. Peng, X. Wang, J. Wu, H. Chen, J. Xu // Biosensors (Basel). – 2024. – V. 14(3). – P.139.
50. Chen, Z. Comparison of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification, conventional PCR and real-time PCR assays for Japanese

- encephalitis virus / Z. Chen, Y. Liao, X. Ke, J. Zhou, Y. Chen, L. Gao, Q. Chen, S. Yu // *Mol. Biol. Rep.* – 2011. – V. 38(6). – P. 4063-4070.
51. Cheng, Y. Recent advances in microRNA detection / Y. Cheng, L. Dong, J. Zhang, Y. Zhao, Z. Li // *Analyst.* – 2018 – V. 143(8). – P.1758-1774.
52. Cheng, Y. Recent advances in microRNA detection / Y. Cheng, L. Dong, J. Zhang, Y. Zhao, Z. Li // *Analyst.* – 2018. – V. 143(8). – P.1758-1774.
53. Cheng, Y.-H. Computational intelligence based polymerase chain reaction primer selection based on a novel teaching-learning-based optimization / Y.-H. Cheng // *IET Nanobiotechnol.* – 2014. – V. 8. – P. 238-246. doi:10.1049/iet-nbt.2013.0055.
54. Chuang, L.Y. PCR-CTPP design for enzyme-free SNP genotyping using memetic algorithm / L.Y. Chuang, Y.H. Cheng, C.H. Yang // *IEEE Trans. Nanobioscience.* – 2015. – V. 14. – P. 13-23.
55. Chuang, L.Y. Specific primer design for the polymerase chain reaction / L.Y. Chuang, Y.H. Cheng, C.H. Yang // *Biotechnol. Lett.* – 2013. – V. 35. —P. 1541-1549.
56. Dangerfield, T.L. Kinetics of elementary steps in loop-mediated isothermal amplification (LAMP) show that strand invasion during initiation is rate-limiting / T.L. Dangerfield, I. Paik, S. Bhadra, K.A. Johnson, A.D. Ellington // *Nucleic Acids Res.* – 2023 – V. 51(1). – P. 488-499.
57. Dave, V.P. Bang, MicroRNA amplification and detection technologies: opportunities and challenges for point of care diagnostics / V.P. Dave , T.A. Ngo, A.-K. Pernestig, D. Tilevik, K. Kant, T. Nguyen, A. Wolff // *Lab. Investig.* – 2019. – V.99 (4). – P. 452–469.
58. Deng, R. Isothermal Amplification for MicroRNA Detection: From the Test Tube to the Cell / R. Deng, K. Zhang, J. Li. // *Acc. Chem. Res.* – 2017. – V. 50(4). – P. 1059-1068.
59. Ding, X. Dual-Priming Isothermal Amplification (DAMP) for Highly Sensitive and Specific Molecular Detection with Ultralow Nonspecific

- Signals / X. Ding, Z. Xu, K. Yin, M. Sfeir, C. Liu // *Anal. Chem.* – 2019. – V. 91(20). – P.12852-12858.
60. Dolatabadian, A. Characterization of disease resistance genes in the *Brassica napus* pangenome reveals significant structural variation / A. Dolatabadian, P.E. Bayer, S. Tirnaz, B. Hurgobin, D. Edwards, J. Batley // *Plant Biotechnol. J.* – 2020 – V. 18(4). – P. 969-982.
61. El-Tholoth, M. Single and TwoStage, Closed-Tube, Molecular Test for the 2019 Novel Coronavirus (COVID-19) at Home, Clinic, and Points of Entry / M. El-Tholoth, H.H. Bau, J. A. Song // *ChemRxiv.* - 2021. – V. 93(38). – P. 13063-13071
62. Esquela-Kerscher, A. Oncomirs — microRNAs with a role in cancer / A. Esquela-Kerscher, F. Slack // *Nat Rev Cancer.* - 2006. – V.6. – P. 259–269.
63. Feddema, J.J. Commercial Opportunity or Addressing Unmet Needs-Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) as the Future of Rapid Diagnostic Testing? / J.J. Feddema, K.D.S Fernald, B.J.F. Keijser, K. Jasper, L.H.M. van de Burgwal // *Diagnostics (Basel).* – 2024 – V. 14(17). – P.1845.
64. Francis, F. ThermoAlign: a genome-aware primer design tool for tiled amplicon resequencing / F. Francis, M.D. Dumas, R.J. Wisser // *Sci. Rep.* – 2017. – V. 7. – P. 44437.
65. Francois, P. Robustness of a loop-mediated isothermal amplification reaction for diagnostic applications. *FEMS Immunol* / P. Francois, M. Tangomo, J. Hibbs, E.J. Bonetti, C.C. Boehme, T. Notomi, et al. // *Med. Microbiol.* – 2011. – V. 62(1). – P. 41-48.
66. Gandelman, O. Loop-mediated amplification accelerated by stem primers / O. Gandelman, R. Jackson, G. Kiddle, L. Tisi // *Int. J. Mol. Sci.* – 2011. – V. 12(12). – P.9108-9124.
67. Gao, L. The tomato pan-genome uncovers new genes and a rare allele regulating fruit flavor / L. Gao, I. Gonda, H. Sun, Q. Ma, K. Bao, et al. // *Nat. Genet.* – 2019. – V. 51(6). – P.1044-1051.

68. Gao, P. K. The shift of microbial population composition accompanying the injected water flowing in the water-flooding petroleum reservoirs / P. K. Gao, G. Q. Li, H. M. Tian, Y. S. Wang, H. W. Sun, T. Ma // *Biogeosciences Discussions* – 2014. – V. 11(12). – P.16773-16797.
69. Gao, X. Pullulan reduces the nonspecific amplification of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) / X. Gao, B. Sun, Y. Guan // *Anal. Bioanal. Chem.* - 2019. - V. 411(6) – P. 1211-1218.
70. Garafutdinov, R.R. DNA Amplification with abutting primers / R.R. Garafutdinov, A.A. Galimova, A.R. Sakhabutdinova, V.A. Vakhitov, A.V. Chemeris // *Mol. Biol.* – 2015. – V. 49(4). – P. 560-568.
71. Garafutdinov, R.R. Polymerase chain reaction with nearby primers / R.R. Garafutdinov, A.A. Galimova, A.R. Sakhabutdinova // *Anal. Biochem.* – 2017. – V. 518. – P. 126-133.
72. Garafutdinov, R.R. Prevention of DNA multimerization during isothermal amplification with Bst exo- DNA polymerase / R.R. Garafutdinov, A.R. Sakhabutdinova, M.S. Kupryushkin, D.V. Pyshnyi // *Biochimie.* – 2020. – V. 168. – P. 259-267.
73. Garafutdinov, R.R. The influence of reaction conditions on DNA multimerization during isothermal amplification with Bst DNA polymerase / R.R. Garafutdinov, A.R. Gilvanov, A.R. Sakhabutdinova // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2020. – V. 190(2). – P.758-771.
74. Garafutdinov, R.R., Galimova A.A., Sakhabutdinova A.R. The influence of quality of primers on the formation of primer dimers in PCR / R.R. Garafutdinov, A.A. Galimova, A.R. Sakhabutdinova // *Nucleos. Nucleot. Nucleic Acids.* – 2020. – V. 39(9). – P. 1251-1269.
75. García-Bernalt, D. J. SMART-LAMP: A Smartphone-Operated Handheld Device for Real-Time Colorimetric Point-of-Care Diagnosis of Infectious Diseases via Loop-Mediated Isothermal Amplification / D. J. García-Bernalt, P. Fernández-Soto, S. Márquez-Sánchez, S. D. Santos, B. Febrer-Sendra, B. Crego-Vicente, J. L. Muñoz-Bellido, M. Belhassen-García, J. M.

- Corchado Rodríguez, A. Muro // *Biosensors (Basel)*. – 2022. – V. 12(6) – P. 424.
76. GenBank Overview. What is GenBank? (Электронный ресурс). – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> (дата обращения: 22.04.2021).
77. Glick, L. Panoramic: A package for constructing eukaryotic pan-genomes / L. Glick, I. Mayrose // *Mol. Ecol. Resour.* – 2021. – V. 21(4). – P.1393-1403.
78. Gordon, M.I. Mathematical modeling of a real-time isothermal amplification assay for *Erwinia amylovora* / M.I. Gordon, D.P. Klemmer, S.L. Fuller, J.H. Chang, D.R. Klemmer, M.L. Putnam // *Engineering Reports*. – 2019. – V. 1(3):e12047.
79. Gordon, S.P. Extensive gene content variation in the *Brachypodium distachyon* pan-genome correlates with population structure / S.P. Gordon, B. Contreras-Moreira, D.P. Woods, D.L. Des Marais, D. Burgess, S. Shu, et al. // *Nat. Commun.* – 2017. – V. 8(1). – P.2184.
80. Guan, W.J. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China / W.J. Guan, Z.Y. Ni, Y. Hu, W.H. Liang, C.Q. Ou, et al. // *N. Engl. J. Med.* – 2020. – V. 382. – P. 1708-1720.
81. Gui, S. A pan-*Zea* genome map for enhancing maize improvement / S. Gui, W. Wei, C. Jiang, J. Luo, L. Chen, S. Wu, et al. // *Genome Biol.* – 2022. – V. 23(1). – P.178.
82. Guo, N. A graph-based pan-genome of *Brassica oleracea* provides new insights into its domestication and morphotype diversification / N. Guo, S. Wang, T. Wang, M. Duan, M. Zong, L. Miao, S. Han, G. Wang, X. Liu, D. Zhang, C. Jiao, H. Xu, L. Chen, Z. Fei, J. Li, F. Liu // *Plant Commun.* – 2024. – V. 5(2):100791.
83. Hardinge, P. Lack of specificity associated with using molecular beacons in loop mediated amplification assays / P. Hardinge, J.A.H. Murray // *BMC Biotechnol.* – 2019. – V. 19(1). – P.55.

84. Hendling, M. Oli2go: an automated multiplex oligonucleotide design tool / M. Hendling, S. Pabinger, K. Peters, N. Wolff, R. Conzemius, I. Barišić // *Nucleic Acids Res.* – 2018. – V. 46(1). – P. 252-256.
85. Hou, X. Primer Spanner: a webbased platform to design PCR primers for high efficient site-directed mutagenesis and DNA assembling / X. Hou, Z. Pei, X. Wei // *Minerva Biotechnologica* – 2018. – V. 30(1). – P. 7-13.
86. Hsieh, K. Simultaneous elimination of carryover contamination and detection of DNA with uracil-DNAGlycosylase-supplemented loop-mediated isothermal amplification (UDG-LAMP) / K. Hsieh, P.L. Mage, A.T. Csordas, M. Eisenstein, H.T. Soh // *Chem. Commun (Camb).* - 2014. - V. 50(28). – P.3747-3749.
87. Huang, P. A Rapid and Specific Assay for the Detection of MERSCoV / P. Huang, H. Wang, Z. Cao, H. Jin, H. Chi, J. Zhao, B. Yu, F. Yan, X. Hu, F. Wu, C. Jiao, P. Hou, S. Xu, Y. Zhao, N. Feng, J. Wang, W. Sun, T. Wang, Y. Gao, S. Yang, X. Xia. // *Front Microbiol.* - 2018. -V.9. – P. 1101.
88. Huang, Y. The discovery approaches and detection methods of microRNAs. / Y. Huang, Q. Zou, S.P. Wang, S.M. Tang, G.Z. Zhang, X.J. Shen // *Mol. Biol. Rep.* – 2011. – V. 38 (6). – P. 4125–4135.
89. Hübner, S. Sunflower pan-genome analysis shows that hybridization altered gene content and disease resistance / S. Hübner, N. Bercovich, M. Todesco, J.R. Mandel, J. Odenheimer, et al. // *Nat. Plants.* – 2019. – V. 5(1). – P.54-62.
90. Imai, K. A novel diagnostic method for malaria using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and MinION nanopore sequencer / K. Imai, N. Tarumoto, K. Misawa, L.R. Runtuwene, J. Sakai, K. Hayashida, Y. Eshita, R. Maeda, J. Tuda, T. Murakami, S. Maesaki, Y. Suzuki, J. Yamagishi, T. Maeda. // *BMC Infect. Dis.* - 2017. - V. 17(1). P. 621.
91. Isothermal Amplification. (Электронный ресурс). – URL: <https://lamp.neb.com/#/> (дата обращения: 25.02.2021).

92. Iertools в Python (Электронный ресурс). – URL: <https://habr.com/ru/companies/otus/articles/529356/> (дата обращения: 21.04.2021).
93. Jayakodi, M. Structural variation in the pangenome of wild and domesticated barley / M. Jayakodi, Q. Lu, H. Pidon, M.T. Rabanus-Wallace, M. Bayer, T. Lux, et al. // *Nature*. – 2024. – V. 636(8043). – P. 654-662.
94. Jayakodi, M. The barley pan-genome reveals the hidden legacy of mutation breeding / M. Jayakodi, S. Padmarasu, G. Haberer, V.S. Bonthala, H. Gundlach, C. Monat, et al. // *Nature*. – 2020. – V. 588(7837). – P. 284-289.
95. Jia, B. GLAPD: Whole Genome Based LAMP Primer Design for a Set of Target Genomes / B. Jia, X. Li, W. Liu, C. Lu, X. Lu, et al. // *Front Microbiol.* – 2019. – V. 10. – P. 1-9.
96. Johnston, A.D., Lu, J., Ru, K.L., Korbie, D., Trau, M. PrimerROC: accurate condition-independent dimer prediction using ROC analysis / A.D. Johnston, J. Lu, K.L. Ru, D. Korbie, M. Trau // *Sci. Rep.* – 2019. – V. 9. – P. 209.
97. Kalendar R. FastPCR: An in silico tool for fast primer and probe design and advanced sequence analysis / R. Kalendar, B. Khassenov, Y. Ramankulov, O. Samuilova, K.I. Ivanov // *Genomics*. – 2017. – V.109(3-4). – P. 312-319.
98. Kalendar, R. FastPCR software for PCR, in silico PCR, and oligonucleotide assembly and analysis / R. Kalendar, D. Lee, A.H. Schulman // *Methods Mol. Biol.* – 2014. – V.1116. – P.271-302.
99. Kalendar, R. In Silico PCR Tools for a Fast Primer, Probe, and Advanced Searching / R. Kalendar, A. Muterko, M. Shamekova, K. Zhambakin // *Methods. Mol. Biol.* – 2017. – V. 1620. – P. 1-31.
100. Kalendar, R. Introduction on Using the FastPCR Software and the Related Java Web Tools for PCR and Oligonucleotide Assembly and Analysis / R. Kalendar, T.V. Tselykh, B. Khassenov, E.M. Ramanculov // *Methods. Mol. Biol.* – 2017. – V.1620. – P. 33- 64.
101. Kalendar, R. Introduction on using the FastPCR software and the related Java web tools for PCR and oligonucleotide assembly and analysis in PCR /

- R. Kalendar, T.V. Tselykh, B. Khasenov, E.M. Ramanculov // *Methods Mol. Biol.* – 2017. – V. 1620. – P. 33-64.
102. Kalendar, R. Java web tools for PCR, in silico PCR, and oligonucleotide assembly and analysis / R. Kalendar, D. Lee, A. H. Schulman // *Genomics.* – 2011. – V. 98(2). – P. 137-144.
103. Kang, S. Highly Multiplexed Reverse-Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification and Nanopore Sequencing (LAMPore) for Wastewater-Based Surveillance / S. Kang, P. Choi, A. Maile-Moskowitz, C.L. Brown, R.A. Gonzalez, A. Pruden, P.J. Vikesland // *ACS ES T Water.* – 2024. – V.4 (4). – P.1629-1636.
104. Kang, S.T. miPrimer: an empiricalbased qPCR primer design method for small noncoding microRNA / S.T. Kang, Y.S. Hsieh, C.T. Feng, Y.T. Chen, P.E. Yang, W.M. Chen // *RNA.* – 2018. – V. 24(3). – P. 3304-3312.
105. Karetnikov, D.I. Analysis of Genome Structure and Its Variations in Potato Cultivars Grown in Russia / D.I. Karetnikov, G.V. Vasiliev, S.V. Toshchakov, N.A. Shmakov, M.A. Genaev, et al. // *Int. J. Mol. Sci.* – 2023. – V. 24(6). – P.5713.
106. Kaur, N. A stoichiometric and pseudo kinetic model of loop mediated isothermal amplification / N. Kaur, N. Thota, B.J. Toley // *Comput Struct Biotechnol J.* – 2020. – V. 18. – P.2336-2346.
107. Kim, H. MRPrimerV: a database of PCR primers for RNA virus detection / H. Kim, N. Kang, K.H. An, D. Kim, J.H. Koo, M.S. Kim // *Nucleic Acids Res.* – 2017. – V. 45. – P. 475-481.
108. Kitchen, J.L. MCMC-ODPR: primer design optimization using Markov Chain Monte Carlo sampling / J.L. Kitchen, J.D. Moore, S.A. Palmer, R.G. Allaby // *BMC Bioinformatics.* – 2012. – V. 13(1). – P. 287.
109. Konwar, K. Approximation Algorithms for Minimum PCR Primer Set Selection with Amplification Length and Uniqueness Constraints / K. Konwar, I. Mandoiu, A. Russell, A. Shvartsman. – 2004 (Электронный

- ресурс). – URL: <https://www.researchgate.net/publication/220482337> (дата обращения 20.12.2020).
110. Koonin, E.V. Genomics of bacteria and archaea: the emerging dynamic view of the prokaryotic world / E.V. Koonin, Y.I. Wolf // *Nucleic Acids Res.* – 2008. – V. 36(21). – P.6688-6719.
  111. Koressaar, T. Primer3\_masker: integrating masking of template sequence with primer design software / T. Koressaar, M. Lepamets, L. Kaplinski, K. Raime, R. Andreson, M. Remm // *Bioinformatics.* – 2018. – V. 34(11). – P. 1937-1941.
  112. Krasnov, G.S. MethyMer: Design of combinations of specific primers for bisulfite sequencing of complete CpG islands / G.S. Krasnov, N.V. Melnikova, V.A. Lakunina, A.V. Snezhkina, A.V. Kudryavtseva, A.A. Dmitriev // *J. Bioinform. Comput. Biol.*– 2018. – V. 16(1):1840004.
  113. Lai, J. Genome-wide patterns of genetic variation among elite maize inbred lines / J. Lai, R. Li, X. Xu, W. Jin, M. Xu, H. Zhao, Z. Xiang, W. Song, K. Ying, M. Zhang, Y. Jiao, P. Ni, J. Zhang, D. Li, X. Guo, K. Ye, M. Jian, B. Wang, H. Zheng, H. Liang, X. Zhang, S. Wang, S. Chen, J. Li, Y. Fu, N.M. Springer, H. Yang, J. Wang, J. Dai, P.S. Schnable, J. Wang // *Nat. Genet.* – 2010 – V. 42(11). – P.1027-1030.
  114. Lamas, A. Evaluation of the effect of outer primer structure, and inner primer linker sequences, in the performance of Loop-mediated isothermal amplification / A. Lamas, S. Azinheiro, F. Roumani, M. Prado, A. Garrido-Maestu // *Talanta.* – 2023. – V. 260. – P.124642.
  115. LAMP Designer. Design Primers for Loop Mediated Isothermal Amplification. (Электронный ресурс). – URL: [LAMP :: Design primers for Loop-Mediated Isothermal Amplification \(premierbiosoft.com\)](http://LAMP::Design%20primers%20for%20Loop-Mediated%20Isothermal%20Amplification%20(premierbiosoft.com)) (дата обращения: 22.04.2021).
  116. LAMP primer designing software. Primer Explorer (Электронный ресурс). – URL: [https://primerexplorer.jp/e/v4\\_manual/index.html](https://primerexplorer.jp/e/v4_manual/index.html) (дата обращения 21.10.202).

117. Lefever, S. High-throughput PCR assay design for targeted resequencing using primerXL / S. Lefever, F. Pattyn, B. De Wilde, F. Coppieters, S. De Keulenaer Helleman, J. Vandesompele // *BMC Bioinform.* – 2017. – V. 18(1). – P. 400.
118. Li, N. Super-pangenome analyses highlight genomic diversity and structural variation across wild and cultivated tomato species / N. Li, Q. He, J. Wang, B. Wang, J. Zhao, S. Huang, et al. // *Nat. Genet.* – 2023. – V. 55(5). – P.852-860.
119. Li, Q. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus – Infected Pneumonia / Q. Li, X. Guan, P. Wu, X. Wang, L. Zhou, et al. // *N. Engl. J. Med.* – 2020. – V. 382(13). – P. 1199-1207.
120. Li, X. Large-scale gene expression alterations introduced by structural variation drive morphotype diversification in *Brassica oleracea* / Y. Wang, C. Cai, J. Ji, F. Han, L. Zhang, S. Chen, L. Zhang, Y. Yang, Q. Tang, J. Bucher, X. Wang, L. Yang, M. Zhuang, K. Zhang, H. Lv, G. Bonnema, Y. Zhang, F. Cheng // *Nat. Genet.* – 2024. – V. 56(3). – P.517-529.
121. Li, Y.H. De novo assembly of soybean wild relatives for pan-genome analysis of diversity and agronomic traits / Y.H. Li, G. Zhou, J. Ma, W. Jiang, L.G. Jin, Z. Zhang, et al. // *Nat. Biotechnol.* – 2014. – V. 32(10). – P.1045-1052.
122. Liang, Q. A view of the pan-genome of domesticated Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) / Q. Liang, M. Muñoz-Amatriaín, S. Shu, S. Lo, X. Wu, J.W. Carlson, et al. *Lonardi* // *Plant Genome.* – 2024. – V. 17(1). – P.e20319.
123. Liu, C. Deciphering variation of 239 elite japonica rice genomes for whole genome sequences-enabled breeding / C. Liu, P. Peng, W. Li, C. Ye, S. Zhang, et al. // *Genomics.* – 2021. – V. 113(5). – P.3083-3091.
124. Liu, K. Research progress in molecular biology related quantitative methods of MicroRNA / K. Liu, H. Tong, T. Li, X. Wang, Y. Chen // *Am. J. Transl. Res.* – 2020 – V. 12(7). – P.3198-3211

125. Liu, Y. Super graph-based pan-genome: Bringing rice functional genomic study into a new dawn / Y. Liu, Z. Tian // *Mol. Plant.* – 2022. – V. 15(9). – P.1409-1411.
126. Liu, Z. Grapevine pangenome facilitates trait genetics and genomic breeding / N. Wang, Y. Su, Q. Long, Y. Peng, L. Shangguan, F. Zhang, et al. // *Nat. Genet.* – 2024. – V. 56(12). – P.2804-2814.
127. Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Tutorial. Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Tutorial. NEB LAMP. (Электронный ресурс). – URL: <https://www.neb.com/en/tools-and-resources/video-library/loop-mediated-isothermal-amplification-lamp-tutorial> (дата обращения: 25.02.2021).
128. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): Primer Design and Assay Optimization (Электронный ресурс). – URL: <https://youtu.be/GJkvQqDufh> (дата обращения: 15.10.2020).
129. Lu, R. Development of a Novel Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Rapid Detection of SARS-CoV-2 / R. Lu, X. Wu, Z. Wan, Y. Li, L. Zuo, J. Qin, X. Jin, C. Zhang. // *Virologica Sinica.* - 2020.- V. 35(4). – P. 499.
130. Lu. J. PrimerSuite: A High-Throughput WebBased Primer Design Program for Multiplex Bisulfite PCR / J. Lu, A. Johnston, P. Berichon, K.L. Ru, D. Korbie, M. Trau // *Sci. Rep.* – 2017. – V. 7. – P. 41328.
131. Ma, C. A novel method to control carryover contamination in isothermal nucleic acid amplification / C. Ma, F. Wang, X. Wang, L. Han, H. Jing, H. Zhang, C. Shi. // *Chem. Comm. (Camb).* - 2017. - V. 53(77). P. 10696-10699.
132. Mansfeld, B. Genome of the North American wild apple species *Malus angustifolia* / B. Mansfeld, O. Shujun, E. Burchard, A. Yocca, A. Harkess, B. Gutierrez, et al. // *bioRxiv.* – 2023. – V. 11(16). – P.567428.
133. Martineau, R.L. Improved Performance of Loop-Mediated Isothermal Amplification Assays via Swarm Priming / R.L. Martineau, S.A. Murray, S.

- Ci, W. Gao, S.H. Chao, D.R. Meldrum // *Anal. Chem.* – 2017. – V. 89(1). – P.625-632.
134. Mathew, R. Updates on the Current Technologies for microRNA Profiling / R. Mathew, V. Mattei, M. Al. Hashmi, S. Tomei // *Microna.* – 2020. – V. 9(1). – P.17-24.
135. Maximato/lamprim. (Электронный ресурс). – URL: <https://github.com/Maximato/lamprim> (дата обращения: 21.06.2020).
136. Meagher, R.J. Impact of primer dimers and self-amplifying hairpins on reverse transcription loop-mediated isothermal amplification detection of viral RNA / R.J. Meagher, A. Priye, Y.K. Light, C. Huang, E. Wang // *Analyst.* – 2018. – V. 143(8). – P.1924-1933.
137. Moehling, T.J. Effects of single and multiple nucleotide mutations on loop-mediated isothermal amplification / T.J. Moehling, E.R. Browne, R.J. Meagher // *Analyst.* – 2024. – V.149(6). – P.1701-1708.
138. Monat, C. De Novo Assemblies of Three *Oryza glaberrima* Accessions Provide First Insights about Pan-Genome of African Rices / C. Monat, B. Pera, M.N. Ndjondjop, M. Sow, C. Tranchant-Dubreuil, et al. // *Genome Biol. Evol.* – 2017. – V. 9(1). – P.1-6.
139. Montenegro, J.D. The pangenome of hexaploid bread wheat / J.D. Montenegro, A.A. Golicz, P.E. Bayer, B. Hurgobin, H. Lee, C.K. Chan, P. Visendi, K. Lai, J. Doležel, J. Batley, D. Edwards // *Plant J.* – 2017 – V. 90(5). – P.1007-1013.
140. Nagamine, K. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers / K. Nagamine, T. Hase, T. Notomi // *Mol. Cell. Probes.* – 2002. – V.16(3). – P. 223-229.
141. NEB LAMP Primer Design Tool. (Электронный ресурс). – URL: <https://lamp.neb.com/#!/help> (дата обращения: 24.12.2020).
142. Nguyen, H. A, A Rotatable Paper Device Integrating Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification and a Food Dye for Colorimetric

- Detection of Infectious Pathogens / H.A. Nguyen, H. Choi, N.Y. Lee // Biosensors (Basel). - 2022. - V. 12(7). – P. 488.
143. Ning, W. The pan-NLRome analysis based on 23 genomes reveals the diversity of NLRs in Brassica napus / W. Ning, W. Wang, Z. Liu, W. Xie, H. Chen, D. Hong, Q.Y. Yang, S. Cheng, L. Guo // Mol. Breed. – 2024 – V.44(12) – P.2.
144. Nkere, C.K. Chromogenic Detection of Yam Mosaic Virus by Closed-Tube Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification (CT-RT-LAMP) / C.K. Nkere, J.O. Oyekanmi, G. Silva, M. Bömer, G.I. Atiri, J. Onyeka, N.G. Maroya, S.E. Seal, P.L. Kumar // Arch. Virol. – 2018. – V. 163(4). – P.1057-1061.
145. Notomi, T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA / T. Notomi, H. Okayama, H. Masubuchi, T. Yonekawa, K. Watanabe, N. Amino, T. Hase // Nucleic Acids Res. – 2000. – V. 28(12). – e63.
146. O'Halloran, D.M. STITCHER 2.0: primer design for overlapping PCR applications / D.M. O'Halloran, I. Uriagereka-Herburger, K. Bode // Sci. Rep. – 2017. – V. 7. – P. 45349.
147. Oishi, M. An Efficient Particle-Based DNA Circuit System: Catalytic Disassembly of DNA/PEG-Modified Gold Nanoparticle–Magnetic Bead Composites for Colorimetric Detection of miRNA. / M. Oishi, S.J. S. Sugiyama // Small. – 2016. – V. 12 (37). – P. 5153–5158.
148. OligoAnalyzer. Tool (Электронный ресурс). – URL: <https://eu.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer?returnurl=%2Fcalc%2Fanalizer> (дата обращения: 21.07.2021).
149. Pandey, R.V. MSP-HTPrimer: a high-throughput primer design tool to improve assay design for DNA methylation analysis in epigenetics / R.V. Pandey, W. Pulverer, R. Kallmeyer, G. Beikircher, S. Pabinger, A. Kriegner, A. Weinhäusel // Clin. Epigenetics. – 2016. – V. 8. – P. 101.
150. Park, H.C. Enhanced sensitivity of CpG island search and primer design based on predicted CpG island position / H.C. Park, E.R. Ahn, J.Y. Jung,

- J.H. Park, J.W. Lee, S.K. Lim, W. Kim // *Forensic. Sci. Int. Genet.* – 2018. – V. 34. – P. 134-140.
151. Park, K.W. Rapid and ultrasensitive detection of microRNA by target-assisted isothermal exponential amplification coupled with poly (thymine)-templated fluorescent copper nanoparticles / K.W. Park, B.S. Batule, K.S. Kang, K.S. Park, H.G. J.N. Park. // *Nanotechnology.* – 2016. – V. 27(42). – P. 425502.
152. Pearson, W.R. A new approach to primer selection in polymerase chain reaction experiments / W.R. Pearson, G. Robins, D.E. Wrege, T. Zhang // *Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.* – 1995. – V. 3. – P. 285-291.
153. Peyrefitte, C.N. Real-time reversetranscription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of rift valley Fever virus / C.N. Peyrefitte, L. Boubis, D. Coudrier, M. Bouloy, M. Grandadam, H.J. Tolou, S. Plumet // *J. Clin. Microbiol.* - 2008. - V. 46(11). - P. 3653-3659.
154. Pinosio, S. Characterization of the Poplar Pan-Genome by Genome-Wide Identification of Structural Variation / S. Pinosio, S. Giacomello, P. Faivre-Rampant, G. Taylor, V. Jorge, et al. // *Mol. Biol. Evol.* – 2016. – V. 33(10). – P.2706-2719.
155. Pinzon-Reyes, E. Softepagen: Primers design webbased tool for MS-HRM technique / E. Pinzon-Reyes, P. Rondon-Villarreal, W.A. Alvarez., H.G. Hernandez // *IEEE/ACM Trans. Comput. Biol. Bioinform.* – 2020. – V. 17(1). – P. 354-357.
156. Png, A.E.H. Primer design for Whole Genome Amplification using genetic algorithms / A.E.H. Png, K.W. Choo, C.I.P. Lee, S.H. Leong, O.L. Kon // *In Silico Biol.* – 2006. – V. 6. – P. 505-514.
157. Poon, L.L. Evaluation of real-time reverse transcriptase PCR and real-time loop-mediated amplification assays for severe acute respiratory syndrome coronavirus detection / L.L. Poon, B.W. Wong, K.H. Chan, S.S. Ng, K.Y. Yuen, Y. Guan, J.S. Peiris // *Journal of Clinical Microbiology.* - 2005. - V. 43(7). - P. 3457-3459.

158. Prefiks-funktsiya. Algoritm Knuta-Morrisa-Pratta. (Электронный ресурс). – URL: <https://brestprog.by/topics/prefixfunction/> (дата обращения: 24.02.2021).
159. Primer Explorer, разработанная компанией Eiken Chemical Co. LTD, Япония. (Электронный ресурс). – URL: <http://primerexplorer.jp/e> (дата обращения: 02.01.2022).
160. Pyahocorasick (Электронный ресурс). – URL: [pyahocorasick — ahocorasick documentation](#) (дата обращения: 20.04.2021).
161. Qin, P. Pan-genome analysis of 33 genetically diverse rice accessions reveals hidden genomic variations / P. Qin, H. Lu, H. Du, H. Wang, W. Chen, Z. Chen, et al. // Cell. – 2021. – V. 184(13). – P.3542-3558.e16.
162. Rabin-Karp Algorithm for Pattern Searching (Электронный ресурс). – URL: <https://www.geeksforgeeks.org/rabin-karp-algorithm-for-pattern-searching/> (дата обращения: 25.03.2021).
163. Rolando, J.C. Real-time kinetics and high-resolution melt curves in single-molecule digital LAMP to differentiate and study specific and non-specific amplification / J.C. Rolando, E. Jue, J.T. Barlow, R.F. Ismagilov // Nucleic Acids Res. – 2020. – V. 48(7). – P. e42.
164. Ruperao, P. Sorghum Pan-Genome Explores the Functional Utility for Genomic-Assisted Breeding to Accelerate the Genetic Gain // P. Ruperao, N. Thirunavukkarasu, P. Gandham, S. Selvanayagam, M. Govindaraj, B. Nebie, E. Manyasa, R. Gupta, R.R. Das, D.A. Odeny, H. Gandhi, D. Edwards, S.P. Deshpande, A. Rathore // Front Plant Sci. – 2021. – V. 12. P.666342.
165. Saiki, R.K. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia / R.K. Saiki, S. Scharf, F. Faloona, K.B. Mullis, G.T. Horn, H.A. Erlich, N. Arnheim // Science. – 1985. – V. 230. – P. 1350-1354.
166. Saiki, R.K. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase / R.K. Saiki, D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J.

- Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis, H.A. Erlich // *Science*. – 1988. – V 239. – P. 487-491.
167. Sakhabutdinova, A.R. Elimination of DNA Multimerization Arising from Isothermal Amplification in the Presence of Bst Exo-DNA Polymerase / A.R. Sakhabutdinova, L.R. Mirsaeva, I.P. Oscorbin, M.L. Filipenko, R.R. Garafutdinov // *Russ. J. Bioorg. Chem.* – 2020. – V. 46(1). – P. 52-59.
168. Sarashetti, P. Evaluating data requirements for high-quality haplotype-resolved genomes for creating robust pangenome references / P. Sarashetti, J. Lipovac, F. Tomas, M. Šikić, J. Liu // *Genome Biol.* – 2024 – V. 25(1). – P.312.
169. Savonnet, M. Kinetics of Isothermal Dumbbell Exponential Amplification: Effects of Mix Composition on LAMP and Its Derivatives / M. Savonnet, M. Aubret, P. Laurent, Y. Roupioz, M. Cubizolles, A. Buhot // *Biosensors (Basel)*. – 2022. – V. 12(5). – P.346.
170. Sawadogo, J. Impact of Completion Design and Interwell Communication on Well Performance in Full Section Development: A STACK Case Study Using DNA Based Diagnostics / J. Sawadogo, M. Haggerty, C. Mallory, J. Huchton, W. DeAngelis, C. Price // *Society of Petroleum Engineers*. – 2020. – P. SPE-201726-MS.
171. Schatz, M.C. Whole genome de novo assemblies of three divergent strains of rice, *Oryza sativa*, document novel gene space of aus and indica / M.C. Schatz, L.G. Maron, J.C. Stein, W.A. Hernandez, J. Gurtowski, et al. // *Genome Biol.* – 2014. – V. 15(11). – P. 506.
172. Schnable, P.S. The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics / P.S. Schnable, D. Ware, R.S. Fulton, J.C. Stein, F. Wei, S. Pasternak, C. Liang, et al. // *Science*. – 2009. – V. 326(5956). – P. 1112-1115.
173. Schneider, L. Mathematical model to reduce loop mediated isothermal amplification (LAMP) false-positive diagnosis / L. Schneider, H. Blakely, A. Tripathi // *Electrophoresis*. - 2019. - V. 40(20). – P. 2706-2717.

174. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate Wuhan-Hu-1, complete genome (Электронный ресурс). – URL: Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate Wuhan-Hu-1, co - Nucleotide - NCBI (nih.gov). (дата обращения: 21.04.2021).
175. Shang, L. Q. A super pan-genomic landscape of rice / X. Li, H. He, Q. Yuan, Y. Song, Z. Wei, H. Lin, et al. // *Qian Cell Res.* – 2022. – V. 32(10). – P.878-896.
176. Shen, Y. Amplification-based method for microRNA detection / Y. Shen, F. Tian, Z. Chen, R. Li, Q. Ge, Z. Lu. // *Biosens. Bioelectron.* – 2015. – V. 71. – P. 322–331.
177. Shi, T. The super-pangenome of *Populus* unveils genomic facets for its adaptation and diversification in widespread forest trees / T. Shi, X. Zhang, Y. Hou, C. Jia, X. Dan, Y. Zhang, Y. Jiang, et al. // *Mol. Plant.* – 2024. – V. 17(5). P.725-746.
178. Shirato, K. Detection of Middle East respiratory syndrome coronavirus using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) / K. Shirato, T. Yano, S. Senba, S. Akachi, T. Kobayashi, T. Nishinaka, T. Notomi, S. Matsuyama. // *Virol J.* - 2014. -V. 11. - P. 139.
179. Sivakumar, R.  $\beta$ -Cyclodextrin-Stabilized Silver Nanoparticle Production Combined with Loop-Mediated Isothermal Amplification for the Visual Detection of Contagious Pathogens / R. Sivakumar, J.Y. Byun, N.Y. Lee // *Micromachines (Basel).* – 2024. – V. 15(3). – P.378.
180. Song, J.M. Brassica napus pan-genome information resource for 1689 accessions / J.M. Song, D.X. Liu, W.Z. Xie, Z. Yang, L. Guo, K. Liu, Q.Y. Yang, L.L. Chen. // *Plant Biotechnol J.* – 2021. – V. 19(3). – P.412-414.
181. Švara, A. Advancing apple genetics research: *Malus coronaria* and *Malus ioensis* genomes and a gene family-based pangenome of native North American apples / Švara A, Sun H, Fei Z, Khan A. // *DNA Res.* – 2024. – V. 31(5):dsae026.

182. Tian, H. Precise Quantitation of MicroRNA in a Single Cell with Droplet Digital PCR Based on Ligation Reaction / H. Tian, Y. Sun, C. Liu, X. Duan, W. Tang, Z. Li // *Anal. Chem.* – 2016. – V. 88(23). – P.11384-11389.
183. Tian, T. A review: microRNA detection methods / T. Tian, J. Wang, X. Zhou // *Org. Biomol. Chem.* – 2015. – V. 13(8). – P. 2226–2238.
184. Tran, D.H. An at-home and electro-free COVID-19 rapid test based on colorimetric RT-LAMP / D.H. Tran, H.T. Tran, T.N.M. Pham, L.M. Bui, H.T.T. Phung // *J. Infect. Dev. Ctries.* – 2024. – V.18(8). – P.1212-1219.
185. Udugama, B. Diagnosing COVID-19: the disease and tools for detection / B. Udugama, P. Kadhiresan, H.N. Kozlowski, A. Malekjahani, M. Osborne, et al. // *ACS Nano.* – 2020. – V. 14(4). – P. 3822-3835.
186. Vaughn, J.N. Graph-based pangenomics maximizes genotyping density and reveals structural impacts on fungal resistance in melon / J.N. Vaughn, S.E. Branham, B. Abernathy, A.M. Hulse-Kemp, A.R. Rivers, A. Levi, W.P. Wechter // *Nat. Commun.* – 2022. – V. 13(1). – P.7897.
187. Voelker, W.G. Ten new high-quality genome assemblies for diverse bioenergy sorghum genotypes / W.G. Voelker, K. Krishnan, K. Chougule, L.C. Alexander, Z. Lu, A. Olson, D. Ware, K. Songsomboon, C. Ponce, Z.W. Brenton, J.L. Boatwright, E.A. Cooper // *Front Plant Sci.* – 2023 – V.13. – P. 1040909.
188. Walsh, K. Detection of different strains of Potato virus Y and their mixed infections using competitive fluorescent RT-PCR / K. Walsh, J. North, I. Barker, N. Boonham. // *J. Virol. Methods.* – 2001. – V. 91(2). – P.167-173.
189. Wang, C. Development of a Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) System for Rapid Detection of HDV Genotype 1 / C. Wang, X. Shen, J. Lu, L. Zhang // *Lett Appl. Microbiol.* – 2013. – V. 56(3). – P.229-235.
190. Wang, D. Effect of internal primer–template mismatches on loop-mediated isothermal amplification. / D. Wang. // *Biotechnol., Biotechnol. Equipment.* - 2016. - V. 2. – P. 314-318

191. Wang, D.G. Two methods for increased specificity and sensitivity in loop-mediated isothermal amplification / D.G. Wang, J.D. Brewster, M. Paul, P.M. Tomasula // *Molecules*. - 2015. - V. 20(4). - P. 6048-59.
192. Wang, J. A pangenome analysis pipeline provides insights into functional gene identification in rice / J. Wang, W. Yang, S. Zhang, H. Hu, Y. Yuan, J. Dong, et al. // *Genome Biol.* – 2023 – V. 24(1). – P.19.
193. Wang, J. Novel one-step single tube nested quantitative real-time PCR assay for highly sensitive detection of SARS-CoV-2 / J. Wang, K. Cai, R. Zhang, X. He, X. Shen, J. Liu, et al. // *Anal. Chem.* – 2020. – V. 92(13). – P. 9399-9404.
194. Wei, X. Degenerate primer design via clustering / X. Wei, D.N. Kuhn, G. Narasimhan // *Proc. IEEE Comput. Soc. Bioinform. Conf.* – 2003. – V. 2. – P. 75-83.
195. Wu, D. A syntelog-based pan-genome provides insights into rice domestication and de-domestication / D. Wu, L. Xie, Y. Sun, Y. Huang, L. Jia, C. Dong, E. Shen, C.Y. Ye, Q. Qian, L. Fan // *Genome Biol.* – 2023 – V. 24(1). – P.179.
196. Wu, J. A Chromosome Level Genome Assembly of a Winter Turnip Rape (*Brassica rapa* L.) to Explore the Genetic Basis of Cold Tolerance / J. Wu, X.D. Xu, L. Liu, L. Ma, Y. Pu, W. Wang, X.Y. Hua, J.M. Song, K. Liu, G. Lu, Y. Fang, X. Li, W. Sun // *Front Plant Sci.* – 2022. – V. 13. – P.936958.
197. Wu, J.S. Primer design using genetic algorithm / J.S. Wu, C. Lee, C.C. Wu, Y.L. Shiue // *Bioinformatics.* – 2004. – V. 20. – P. 1710-1717.
198. Xie, S. sRNAPrimerDB: comprehensive primer design and search web service for small non-coding RNAs / S. Xie, Q. Zhu, W. Qu, Z. Xu, X. Liu, X. Li, S. Li, W. Ma, Y. Miao, L. Zhang, X. Du, W. Dong, H. Li, C. Zhao, Y. Wang, Y. Fang, S. Zhao // *Bioinformatics.* – 2018. – V. 35(9). – P. 1566-1572.
199. Xu, Y. Chemiluminescence imaging for microRNA detection based on cascade exponential isothermal amplification machinery. / Y. Xu, D. Li, W.

- Cheng, R. Hu, Y. Sang, Y. Yin, S. Ding, H.J. A.C. A. Ju. // *Anal. Chim. Acta.* – 2016. –14 (936). – P. 229-235.
200. Yan, H. Pangenomic analysis identifies structural variation associated with heat tolerance in pearl millet / H. Yan, M. Sun, Z. Zhang, Y. Jin, A. Zhang, C. Lin, et al., // *Nat. Genet.* – 2023. – V. 55(3). – P.507-518.
201. Yang, A.K. Detection of PantoneValentine Leukocidin DNA from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by resistive pulse sensing and loop-mediated isothermal amplification with gold nanoparticles / A.K. Yang, H. Lu, S.Y. Wu, H.C. Kwok, H.P. Ho, S. Yu, A.K. Cheung, S.K. Kong // *Anal. Chim. Acta.* - 2013. - V. 782. - P. 46-53.
202. Yang, C. H. Specific PCR product primer design using memetic algorithm / C. H. Yang, Y. H. Cheng, L. Y. Chuang, H. W. Chang // *Biotechnol. Prog.* – 2009. – V. 25. – P. 745-753.
203. Yang, K.L.A. Using Loop-mediated Isothermal DNA Amplification (LAMP) and Spectral Surface Plasmon Resonance (SPR) to Detect Methicillin-resistance *S. aureus* (MRSA) / K.L.A. Yang, S.Y. Wu, H.C. Kwok, H.P. Ho, S.K. Kong // *Proc. Int. Conf. Biomed. Engin. Biotechnol. iCBEB.* - 2012. – P. 647-650.
204. Yang, T. Improved pea reference genome and pan-genome highlight genomic features and evolutionary characteristics / T. Yang, R. Liu, Y. Luo, S. Hu, D. Wang, et al. // *Nat. Genet.* – 2022. – V. 54(10). – P.1553-1563.
205. Yaylak, B. Experimental MicroRNA Detection Methods / B. Yaylak, B. Akgül // *Methods Mol. Biol.* – 2022. – V. 2257. – P. 33-55.
206. Yaylak, B. Experimental MicroRNA Detection Methods / B. Yaylak, B. Akgül // *Methods Mol. Biol.* – 2022. – V. 2257. – P.33-55.
207. Yogesh, Rana. Python: Simple though an Important Programming language / Rana Yogesh // *International Research Journal of Engineering and Technology (IRJET).* – 2019. – P. 1856-1858.

208. Yu, X. Super pan-genome reveals extensive genomic variations associated with phenotypic divergence in Actinidia / X. Yu, M. Qu, P. Wu, M. Zhou, E. Lai, H. Liu, et al. // *Mol. Hortic.* – 2025. – V. 5(1). – P.4.
209. Zhang, F. Long-read sequencing of 111 rice genomes reveals significantly larger pan-genomes / F. Zhang, H. Xue, X. Dong, M. Li, X. Zheng, Z. Li, et al. // *Genome Res.* – 2022. – V. 32(5). – P.853-863.
210. Zhang, J. Increased sensitivity of RT-PCR for Potato virus Y detection using RNA isolated by a procedure with differential centrifugation / J. Zhang, X. Nie, S. Boquel, F. Al-Daoud, Y. Pelletier // *J.Virol. Methods.* – 2015 – V.225. – P. 49-54.
211. Zhang, M. CRISPR/Cas12a-Assisted Ligation-Initiated Loop-Mediated Isothermal Amplification (CAL-LAMP) for Highly Specific Detection of microRNAs / M. Zhang, H. Wang, H. Wang, F. Wang, Z. Li // *Anal Chem.* – 2021. – V. 93(22). – P.7942-7948.
212. Zhang, M. CRISPR/Cas12a-Assisted Ligation-Initiated Loop-Mediated Isothermal Amplification (CAL-LAMP) for Highly Specific Detection of microRNAs / M. Zhang, H. Wang, H. Wang, F. Wang, Z. Li // *Anal Chem.* – 2021. – V. 93(22). – P.7942-7948.
213. Zhang, Y. Microbial community composition in deep - subsurface reservoir fluids reveals natural interwell connectivity / Y. Zhang, A. E. Dekas, A. J. Hawkins, A. E. Parada, O. Gorbatenko, K. Li, R. N. Horne // *Water Resources Research.* – 2020 – V. 56(2):e2019WR025916.
214. Zhang, Y. Telomere-to-telomere Citrullus super-pangenome provides direction for watermelon breeding / Y. Zhang, M. Zhao, J. Tan, M. Huang, X. Chu, Y. Li, et al. // *Nat. Genet.* –2024. – V. 56(8). – P.1750-1761.
215. Zhang, Z. An LED-Driven AuNPs-PDMS Microfluidic Chip and Integrated Device for the Detection of Digital Loop-Mediated Isothermal DNA Amplification / Z. Zhang, S. Zhao, F. Hu, G. Yang, J. Li, H. Tian, N. Peng // *Micromachines (Basel).* – 2020. – V. 11(2). – P. 177.

216. Zhao, J. Trait associations in the pangenome of pigeon pea (*Cajanus cajan*) / J. Zhao, P.E. Bayer, P. Ruperao, R.K. Saxena, A.W. Khan, A.A. Golicz, H.T. Nguyen, J. Batley, D. Edwards, R.K. Varshney // *Plant Biotechnol. J.* – 2020. – V. 18(9). – P.1946-1954.
217. Zhou, P. Exploring structural variation and gene family architecture with De Novo assemblies of 15 *Medicago* genomes / P. Zhou, K.A. Silverstein, T. Ramaraj, J. Guhlin, R. Denny, J. Liu, A.D. Farmer, K.P. Steele, R.M. Stupar, J.R. Miller, P. Tiffin, J. Mudge, N.D. Young // *BMC Genomics.* – 2017. – V. 18(1). – P.261.
218. Zhou, Y. A platinum standard pan-genome resource that represents the population structure of Asian rice / Y. Zhou, D. Chebotarov, D. Kudrna, V. Llaca, S. Lee, et al. // *Sci. Data.* – 2020. – V. 7(1). – P.113.
219. Zhou, Y. Pan-genome inversion index reveals evolutionary insights into the subpopulation structure of Asian rice / Y. Zhou, Z. Yu, D. Chebotarov, K. Chougule, Z. Lu, et al. // *Nat. Commun.* – 2023. – V. 14(1). – P.1567.
220. Zou, B. MIPE: A metagenome-based community structure explorer and SSU primer evaluation tool / B. Zou, J. Li, Q. Zhou, Z.X. Quan // *PLoS One.* – 2017. – V. 12(3):e0174609.

# ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Свидетельства о регистрации программ для ЭВМ

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



**СВИДЕТЕЛЬСТВО**  
о государственной регистрации программы для ЭВМ  
**№ 2022617417**

**LAMPrimers iQ (Loop-mediated isothermal amplification Primers iQ)**

Правообладатели: *Ахметзянова Лиана Ульфатовна (RU), Давлеткулов Тимур Маратович (RU), Гарафутдинов Равиль Ринатович (RU), Чемерис Алексей Викторович (RU), Губайдуллин Ирек Марсович (RU)*

Авторы: *Ахметзянова Лиана Ульфатовна (RU), Давлеткулов Тимур Маратович (RU), Гарафутдинов Равиль Ринатович (RU), Чемерис Алексей Викторович (RU), Губайдуллин Ирек Марсович (RU)*



Заявка № **2022616139**  
Дата поступления **06 апреля 2022 г.**  
Дата государственной регистрации  
в Реестре программ для ЭВМ **20 апреля 2022 г.**

Руководитель Федеральной службы  
по интеллектуальной собственности  
  
Ю.С. Зубов

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



## СВИДЕТЕЛЬСТВО

о государственной регистрации программы для ЭВМ

№ 2023662840

**Дизайн праймеров для петлевой изотермической  
амплификации (LAMPrimers iQ\_loop)**

Правообладатели: *Ахметзянова Лиана Ульфатовна (RU),  
Давлеткулов Тимур Маратович (RU), Хайритдинов Валерий  
Данилевич (RU), Гарафутдинов Равиль Ринатович (RU),  
Губайдуллин Ирек Марсович (RU)*

Авторы: *Ахметзянова Лиана Ульфатовна (RU), Давлеткулов  
Тимур Маратович (RU), Хайритдинов Валерий Данилевич  
(RU), Гарафутдинов Равиль Ринатович (RU), Губайдуллин  
Ирек Марсович (RU)*

Заявка № 2023661826

Дата поступления **05 июня 2023 г.**

Дата государственной регистрации  
в Реестре программ для ЭВМ **14 июня 2023 г.**



*Руководитель Федеральной службы  
по интеллектуальной собственности*

Документ подписан электронной подписью  
Сертификат: 429b640e3853164ba9e183b73b4aa7  
Владелец: **Зубов Юрий Сергеевич**  
Действителен с 08.03.2023 по 02.08.2034

*Ю.С. Зубов*

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



## СВИДЕТЕЛЬСТВО

о государственной регистрации программы для ЭВМ

№ 2025615182

«Дизайн праймеров для LAMP-амплификации  
микроРНК (miRLAMP)»

Правообладатели: *Ахметзянова Лиана Ульфатовна (RU),  
Хайритдинов Валерий Данилевич (RU), Губайдуллин Ирек  
Марсович (RU), Гарафутдинов Равиль Ринатович (RU), Чемерис  
Алексей Викторович (RU), Арсланова Регина Хамитовна (RU)*

Авторы: *Ахметзянова Лиана Ульфатовна (RU), Хайритдинов  
Валерий Данилевич (RU), Губайдуллин Ирек Марсович (RU),  
Гарафутдинов Равиль Ринатович (RU), Чемерис Алексей  
Викторович (RU), Арсланова Регина Хамитовна (RU)*

Заявка № 2025612873

Дата поступления 14 февраля 2025 г.

Дата государственной регистрации

в Реестре программ для ЭВМ 03 марта 2025 г.



Руководитель Федеральной службы  
по интеллектуальной собственности

документ подписан электронной подписью  
Сертификат: 0092e10a0000e5b40c670bca2026  
Владелец: **Зубов Юрий Сергеевич**  
Действителен с 10.12.2014 по 03.10.2025

Ю.С. Зубов

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



## СВИДЕТЕЛЬСТВО

о государственной регистрации программы для ЭВМ

№ 2025617292

**Дизайн олигонуклеотидных шпилечных структур для лигирования на поддерживающей матрице и последующей LAMP-амплификации (LigLAMP)**

Правообладатели: *Ахметзянова Лиана Ульфатовна (RU), Хайретдинов Валерий Данилевич (RU), Арсланова Регина Хамитовна (RU), Гарафутдинов Равиль Ринатович (RU), Чемерис Алексей Викторович (RU)*

Авторы: *Ахметзянова Лиана Ульфатовна (RU), Хайретдинов Валерий Данилевич (RU), Гарафутдинов Равиль Ринатович (RU), Чемерис Алексей Викторович (RU), Арсланова Регина Хамитовна (RU)*

Заявка № 2025615825

Дата поступления 12 марта 2025 г.

Дата государственной регистрации

в Реестре программ для ЭВМ 25 марта 2025 г.



*Руководитель Федеральной службы  
по интеллектуальной собственности*

ДОКУМЕНТ ПОДПИСАН ЭЛЕКТРОННОЙ ПОДПИСЬЮ  
Сертификат: 0692e7c16e700016424016700002026  
Подпись: *Зубов Юрий Сергеевич*  
Действителен с 03.10.2024 по 03.10.2026

*Ю.С. Зубов*