

**ТВЕРДОФАЗНАЯ ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ**© Р. Р. Гарафутдинов<sup>1\*</sup>, Э. Г. Магданов<sup>1</sup>, Р. Ф. Талипов<sup>2</sup>, А. В. Чемерис<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН  
Россия, Республика Башкортостан, 450054 г. Уфа, пр. Октября, 71.  
Тел./факс: +7 (347) 235 60 88.

<sup>2</sup>Башкирский государственный университет  
Россия, Республика Башкортостан, 450074 г. Уфа, ул. Заки Валиди, 32.  
Тел./факс: +7 (347) 273 67 78.  
E-mail: garafutdinovr@gmail.com

*Обзор посвящен описанию особенностей проведения полимеразной цепной реакции на различных твердых фазах, различающихся химической природой фазы (нейлон, полиакриламид, агароза, полистирол, стекло), формой ее исполнения (мембранный фильтр, плоская твердая поверхность, гель, микрочастицы) и способами детекции результатов амплификации.*

**Ключевые слова:** нуклеиновые кислоты, ДНК полимеразы, амплификация, ПЦР на чипах, твердофазная ПЦР, детекция.

**Введение**

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) известна уже четверть века и в настоящее время применяется для решения широкого круга научных и практических задач, что обусловлено высокой чувствительностью и относительной простотой данного метода. По способам проведения и целям, которые ставят перед собой экспериментаторы, ПЦР сейчас можно подразделить на фактически самостоятельные методы – ПЦР по конечной точке, ПЦР в режиме реального времени, а также на цифровую ПЦР. Помимо этих основных вариаций ПЦР, проводимых в подавляющем большинстве случаев в растворе, существует еще так называемая твердофазная ПЦР, под которой понимается процесс амплификации, когда в реакционной смеси присутствует некая твердая фаза и, по крайней мере, один из праймеров на ней прочно фиксирован, в том числе с образованием ковалентных связей. Такими фазами могут служить мембранные фильтры, кремниевые, магнитные, агарозные или иные микро-, наночастицы, поверхность стекла, лунки планшета из полистирола, полиакриламидный гель, во время гелеобразования которого в сополимеризацию с мономерами вовлекается хотя бы один из праймеров. В данной статье из рассмотрения исключены варианты ПЦР, где с использованием твердой фазы проводится ферментативное секвенирование ДНК по Сэнгеру или происходит однонуклеотидное удлинение аллель-специфичного праймера.

Несмотря на заметные сложности, вызванные дополнительными этапами при формировании реакционной смеси в твердофазной ПЦР, у этого способа существуют определенные преимущества перед ПЦР в истинном растворе, заключающиеся в более удобном мультиплексировании анализов, в исключении (уменьшении вероятности) ложнопозитивных результатов при последующих реакциях амплификации, представляющих весьма серьезную проблему [1], а также в использовании более передового формата в виде ДНК-чипов. В вариантах проведения твердофазной ПЦР, в которых на твердой фазе фиксированы оба праймера, можно не особо опасаться какой-либо гомологии между комплектами праймеров ввиду того, что они из-за пространственного разделения на твердой фазе не мо-

гут отжигаться друг на друге и образовывать праймерные димеры, для исключения которых необходимо прибегать к горячему старту, что подробно рассмотрено нами ранее [2]. Общим недостатком всех вариантов твердофазной ПЦР является сниженная эффективность размножения молекул ДНК из-за возникающих стерических проблем.

Несколько удивительным представляется то, что после разработки метода ПЦР [3] прошло немало времени, прежде чем были предложены варианты твердофазной ПЦР, и до сих пор опубликовано не так много методических статей, посвященных этому довольно перспективному направлению развития амплификации нуклеиновых кислот с фиксацией ампликонов на твердой фазе. В данном обзоре нами осуществлена попытка обобщить практически всю имеющуюся в литературе информацию на эту тему.

**Мембранно-связанная ПЦР.****Фиксированная ДНК**

Пожалуй, первой работой, где в реакционной смеси присутствовала твердая фаза в виде мембранного (нейлонового) фильтра, стала статья американских авторов [4]. Однако упомянув во «Введении» о некоторой задержке с разработкой твердофазной ПЦР, данную статью мы во внимание не принимали, поскольку в цитируемой работе амплификация шла в водной фазе, и лишь анализируемая ДНК была изначально сорбирована и фиксирована на мембранном фильтре. Параллельно ими велась обычная ПЦР в растворе, и было показано, что различий в эффективности амплификации не имеется. Был опубликован еще ряд статей, посвященных ПЦР, где в качестве мишени использовалась ДНК, фиксированная на подобных мембранах [5–7], и в названии некоторых из них даже фигурировало словосочетание «solid-phase PCR», что все же не совсем соответствовало тому, что следует понимать под «твердофазной ПЦР».

В качестве некоего преимущества такого подхода с нахождением ДНК на фильтре отмечается возможность использования нейлоновой мембраны с фиксированной ДНК последовательно в разных реакциях амплификации с различными праймерными системами. Теоретически можно допустить, что ДНК на мембране, выступая в качестве матрицы, все время остается фиксированной и не «расхо-

\* автор, ответственный за переписку

дуются», что несколько спорно, поскольку может иметь место обычный (или даже неизбежный) смыс какой-то части связанных нуклеиновых кислот и переход их в раствор. Для того, чтобы убедиться в сохранении фиксированной ДНК на мембране в неизменном виде, готовой служить матрицей в многочисленных последовательных ПЦР, необходимо было провести эксперимент с использованием соответствующих праймеров по амплификации, например, соседних фрагментов ДНК, присутствующих на подходящей молекуле ДНК, связанной с мембраной в виде только единичной копии.

#### **Мембранно-связанная ПЦР.**

##### **Фиксированные праймеры**

Использование мембранно-связанных праймеров позволяет говорить о проведении уже настоящей твердофазной ПЦР, поскольку ампликоны в этом случае фиксированы в конкретных местах фильтра, если не учитывать возможный смыс праймеров с мембраны и амплификации в растворе, поскольку все же этот процесс не должен носить массовый характер. Аллель-специфичный праймер, состоящий из отжигающейся части длиной 29 звеньев и 81 нуклеотида «Т», использовали в твердофазной ПЦР английские авторы [8]. Поскольку было известно, что тимины гораздо лучше сорбируются и фиксируются УФ-светом на нейлоновых мембранах [9], такой «якорь» был изготовлен для более надежной фиксации праймеров на мембранном фильтре с помощью ультрафиолетового света. Полученные результаты показали успешную амплификацию, результаты которой регистрировались с помощью колориметрической детекции с использованием конъюгата щелочной фосфатазы с антителами к дигоксигенину, которым были мечены dUTP, присутствующие в реакционной смеси. Позднее другими авторами была проведена сходная твердофазная ПЦР [10], где праймеры фиксировали на нейлоновых фильтрах или с помощью УФ-света, или запеканием в вакууме при 80°C. Серьезным отличием этой работы было то, что в их экспериментах на мембране были фиксированы оба (прямой и обратный) праймера. Результаты ПЦР оценивали с помощью того же DIG-dUTP, но вместо колориметрической детекции щелочная фосфатаза разрушала диоксетановый субстрат и велась радиоавтография. Было показано, что уровень чувствительности твердофазной ПЦР сопоставим с проводимой в той же работе параллельно обычной ПЦР в растворе. Отмечается, что мембранные нейлоновые фильтры служат хорошей альтернативой стеклянным подложкам при проведении твердофазной ПЦР.

##### **ПЦР в микротитраторных планшетах**

На протяжении целого ряда лет фирмой Nunc (ныне подразделение концерна Thermo Scientific) поставляются NucleoLink микротитраторные полистироловые планшеты или стрипы, выдерживающие температуру до 121 °C и предназначенные для проведения твердофазной ПЦР ([www.nuncbrand.com](http://www.nuncbrand.com)). Они выпускаются в трех вариантах – для колориметрической детекции, детекции люминесценции или флуоресценции с помощью подходящего планшетного анализатора. Для ковалентной пришивки праймер на 5'-конце должен нести или амино-, или

фосфогруппу. Для уменьшения стерических эффектов для праймеров желательна спейсерная группировка, по крайней мере, из 10 тиминов. Опубликованно достаточно много работ, где с использованием таких планшетов или стрипов проведена твердофазная ПЦР и применены различные подходы к детекции результатов амплификации и исследованы некоторые параметры протекания этой реакции [11, 12]. Так, колориметрическая детекция с дигоксигенином была использована для выявления однонуклеотидного полиморфизма у человека [13]. В статье других авторов детекция результатов велась с помощью измерения флуоресценции с разрешением во времени с различными гибридизационными зондами, меченными разными лантанидами (европием, самарием) [14]. Описано использование в твердофазной ПЦР праймеров, меченых антрахиноном [15]. Одна работа посвящена анализу метилирования цитозинов, выявляемому с помощью твердофазной ПЦР, сопряженной с колориметрической детекцией [16].

##### **ПЦР на микро- и наночастицах**

Еще одним типом твердой фазы в ПЦР служат различные частицы. Так, на одной из стадий твердофазной ПЦР предложено использовать агарозные микрочастицы [17]. Парамагнитные частицы, ковалентно-связанные со стрептавидином, использовали в твердофазной ПЦР вкупе с праймерами, меченными по 5'-концу биотином [18, 19]. В нескольких статьях описано применение в качестве твердой фазы для ПЦР кремниевых частиц [20-22]. Благодаря использованию флуоресцентно-меченных дНТФ анализ результатов амплификации проводили с помощью проточного цитофлуориметра. В одной работе использовались праймеры, несущие акриламидную группировку на 5'-конце, что позволило провести их пришивку к полиакриламидным частицам собственного изготовления [23, 24]. Для детекции использовали радиоактивно-меченный dCTP. В одной из работ сообщается об успешном использовании наработанных на твердой фазе на стеклянных микрошариках ампликонов для дальнейших реакций транскрипции и трансляции в системе *in vitro* [25].

Кроме микрочастиц в твердофазной ПЦР нашли применение и наночастицы коллоидного золота диаметром 13 нм [26, 27]. Праймеры своим 5'-концом присоединялись к наночастицам золота через тиогруппу и несли небольшой спейсер. Если в первой из этих работ результаты амплификации оценивались, в том числе, с использованием атомно-силового микроскопа, то во второй с помощью оптоволоконного кабеля детектировался поверхностный плазмонный резонанс.

##### **ПЦР в полиакриламидном геле**

Использование полиакриламидного геля как среды для гибридизации и амплификации специфичных фрагментов нуклеиновых кислот хорошо известно, однако случаи проведения ПЦР без фиксации ампликонов (т.е. хотя бы одного из праймеров) на твердой фазе полиакриламидного геля нами здесь сознательно не рассматриваются, поскольку этому вопросу должна быть посвящена отдельная статья.

Один из способов изготовления полиакриламидных гидрогелевых чипов, несущих иммобили-

зованный праймер, заключается в формировании в геле альдегидных групп перйодатом натрия и их сшивки с олигонуклеотидами, содержащими на 5'-конце аминогруппу [28, 29]. Для контроля результатов амплификации использовался флуоресцентный микроскоп [29, 30], но при этом помимо амплификации на твердой фазе отдельные этапы велись и в растворе, что, по мнению авторов, увеличило эффективность всего процесса. Еще ряд статей, посвященных проведению твердофазной ПЦР в полиакриламидном геле, в том числе с детекцией результатов в режиме реального времени с помощью флуоресцентного микроскопа, опубликованы этой же группой авторов [31, 32]. Ранее другими авторами было показано, что присутствие в растворе универсального праймера, помимо фиксированных в геле, повышает эффективность размножения молекул ДНК в ходе твердофазной ПЦР с использованием полиакриламидного геля, доводя коэффициент амплификации до 1.34 [33]. Китайские авторы использовали твердофазную ПЦР с фиксированным в полиакриламидном геле по 5'-концу праймером для выявления однонуклеотидных замен [34].

#### ПЦР на стекле

Наиболее часто в качестве твердой фазы для ПЦР используется стеклянная поверхность в виде предметных или покровных стекол для микроскопии. Необходимо заметить, что твердофазная амплификация нуклеиновых кислот на таких стеклах кардинально отличается от так называемой ПЦР *in situ*, рассмотрение которой выходит за рамки данного обзора.

В середине 90-х гг. американской фирмой *Mosaic Technologies, Inc.* была предложена твердофазная ПЦР, получившая название «*Bridge PCR*» или «*Мостовая ПЦР*», где оба праймера были фиксированы на твердой фазе, в качестве которой в их работах служили или шарики, или поверхность стекла [35]. Данная технология была ими запатентована [36]. Поскольку оба праймера находились на твердой фазе, то ампликоны образовывали мостики над поверхностью от прямого праймера к обратному и наоборот. К сожалению, эффективность размножения молекул ДНК в их экспериментах оказалась довольно низка, и для выявления образовавшихся ампликонов была применена радиоактивная метка. Позже появилось несколько работ других авторов, в которых оба праймера были фиксированы на твердой фазе, будь то стекло или шарики [37, 24]. Интересные варианты твердофазной ПЦР на стекле дали увеличенную эффективность размножения ДНК благодаря использованию трех праймеров, один из которых, являясь вложенным по отношению к ампликону, также, как и один из основной пары праймеров, был фиксирован на твердой фазе [38, 39]. В литературе имеется еще целый ряд методических статей, посвященных различным вопросам твердофазной ПЦР на стекле [40-44]. Недавно сообщено об успешной одновременной твердофазной амплификации 100 тысяч матриц, размещенных на предметном стекле [45].

Общим недостатком твердофазной ПЦР служит сниженная эффективность амплификации, особенно остро проявляющаяся, если фиксированными

оказываются оба праймера. Экспериментальным и теоретическим вопросам такого снижения производительности процесса амплификации на твердой фазе посвящен ряд статей [12, 22, 46, 47]. Однако следует заметить, что в литературе имеется сообщение об успешной амплификации с помощью ПЦР на твердой фазе протяженных матриц длиной до 6 т.п.н. [48]. Тем не менее, учитывая перспективность твердофазной ПЦР, разрабатываются новые способы фиксации модифицированных праймеров на стекле [49] и прочих плоских носителях [50].

#### Выводы

Завершая описание твердофазной ПЦР, необходимо заметить, что практически все существующие варианты ее проведения не обеспечивают высокоэффективного размножения молекул ДНК, особенно в случаях фиксации обоих праймеров. Хотя для очень многих приложений, включая ДНК-чиповую технологию, использование твердофазной ПЦР представляется весьма перспективным. В этой связи настоятельно требуется разработка новых подходов для осуществления твердофазной ПЦР и методов детекции происходящей амплификации.

Работа была выполнена в рамках государственного контракта с МОН РФ № 16.518.11.7047.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Чемерис А.В., Магданов Э.Г., Гарафутдинов Р.Р., Вахитов В.А. Как исключить появление ложно-положительных результатов при проведении полимеразной цепной реакции // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии. 2012. Т. 8. №3. (в печати).
2. Чемерис Д.А., Магданов Э.Г., Машков О.И., Гарафутдинов Р.Р., Чемерис А.В. ПЦР с отложенным (горячим или задержанным) стартом // Биомика. 2011. Т.2. №2. С.1-8.
3. Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase // *Science*. 1988. V.239. P.487-91.
4. Kadokami Y, Lewis RV. Membrane bound PCR // *Nucleic Acid. Res.* 1990. V. 18. P. 3082.
5. Toranzos G.A., Alvarez A.J. Solid-phase polymerase chain reaction: applications for direct detection of enteric pathogens in waters // *Can. J. Microbiol.* 1992. V. 38. P. 365-369.
6. Toranzos G.A., Alvarez A.J., Dvorsky E.A. Application of the polymerase chain reaction technique to the detection of pathogens in water // *Water science & Technology*. 1993. V. 27. P. 207-210.
7. Alvarez A.J., Buttner M.P., Toranzos G.A., Dvorsky E.A., Toro A., Heikes T.B., Mertikas-Pifer L.E., Stetzenbach L.D. Use of solid-phase PCR for enhanced detection of airborne microorganisms // *Appl. Environ. Microbiol.* 1994. V.60. P. 374-376.
8. Lockley A.K, Jones C.G., Bruce J.S., Franklin S.J., Bardsley R.G. Colorimetric detection of immobilised PCR products generated on a solid support // *Nucleic Acids Res.* - 1997. - V.25, P. 1313-1314.
9. Church G.M., Gilbert W. Genomic sequencing // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1984. V. 81. P. 1991-1995.
10. Onodera K., d'Offay J., Melcher U. Nylon membrane-immobilized PCR for detection of bovine viruses // *Biotechniques*. 2002. P. 32. 74, 78, 80.
11. Oroskar A.A., Rasmussen S.E., Rasmussen H.N., Rasmussen S.R., Sullivan B.M., Johansson A. Detection of immobilized amplicons by ELISA-like techniques // *Clin. Chem.* 1996. V. 42. P. 1547-1555.
12. Carmon A., Vision T.J, Mitchell S.E., Thannhauser T.W., Müller U., Kresovich S. Solid-phase PCR in microwells: effects of linker length and composition on tethering, hybridization, and extension // *Biotechniques*. 2002. V. 32. P. 410, 412, 414, 420.
13. Turner M.S., Penning S., Sharp A., Hyland V.J., Harris R., Morris C.P., van Daal A. Solid-phase amplification for detec-

- tion of C282y and H63D hemochromatosis (HFE) gene mutations // *Clin. Chem.* 2001. V. 47. P. 1384–1389.
14. Sjöroos M, Ilonen J, Lövgren T. Solid-phase PCR with hybridization and time-resolved fluorometry for detection of HLA-B\*27 // *Clin. Chem.* 2001. V. 47. P. 498–504.
  15. Koch T., Jacobsen N., Fensholdt J., Boas U., Fenger M., Jakobsen M.H. Photochemical immobilization of anthraquinone conjugated oligonucleotides and PCR amplicons on solid surfaces // *Bioconjug. Chem.* 2000. V. 11. P. 474–483.
  16. Sievers S., Fritzsche C., Kuhnen C., Müller O. SPSP: a solid-phase PCR with colorimetric read-out for quantitative methylation analysis // *Anticancer Res.* 2008. V. 28, P. 2055–2060.
  17. Stamm S., Brosius J. Anchored PCR: PCR with cDNA coupled to a solid phase // *Nucleic Acids Res.* 1991. V. 19. P. 1350.
  18. Dressman D, Yan H, Traverso G, Kinzler KW, Vogelstein B. Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. V. 100. P. 8817–8822.
  19. Liu H, Li S, Wang Z, Ji M, Nie L, He N. High-throughput SNP genotyping based on solid-phase PCR on magnetic nanoparticles with dual-color hybridization // *J Biotechnol.* 2007. V. 131. P. 217–222.
  20. Khan Z., Poetter K., Park D.J. Enhanced solid phase PCR: mechanisms to increase priming by solid support primers // *Anal Biochem.* 2008. V. 375. P. 391–393.
  21. Park D.J. Enhanced solid phase PCR for increased loading of amplicon onto solid support // *Methods Mol Biol.* 2011. V. 687. P. 257–264.
  22. Palanisamy R., Connolly A.R., Trau M. Considerations of solid-phase DNA amplification // *Bioconjug Chem.* 2010. V. 21. P. 690–695.
  23. Rehman F.N., Audeh M., Abrams E.S., Hammond P.W., Kenney M., Boles T.C. Immobilization of acrylamide-modified oligonucleotides by co-polymerization // *Nucleic Acids Res.* 1999. V. 27. P. 649–655.
  24. Shapero M.H., Leuther K.K., Nguyen A., Scott M., Jones K.W. SNP genotyping by multiplexed solid-phase amplification and fluorescent minisequencing // *Genome Res.* 2001. V. 11, P. 1926–1934.
  25. Andreadis J.D., Chrisey L.A. Use of immobilized PCR primers to generate covalently immobilized DNAs for in vitro transcription/translation reactions // *Nucleic Acids Res.* 2000. V. 28.
  26. Shen H.B., Hu M., Wang Y.B., Zhou H.Q. Polymerase chain reaction of nanoparticle-bound primers // *Biophys. Chem.* 2005. V. 115. P. 63–66.
  27. Pollet J., Janssen K.P., Knez K., Lammertyn J. Real-time monitoring of solid-phase PCR using fiber-optic SPR // *Small.* 2011. V. 7, P. 1003–1006.
  28. Yershov G., Barsky V., Belgovskiy A., Kirillov E., Kreindlin E., Ivanov I., Parinov S., Guschin D., Drobishev A., Dubiley S., Mirzabekov A. DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide microchips // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. V. 93. P. 4913–4918.
  29. Strizhkov B.N., Drobyshev A.L., Mikhailovich V.M., Mirzabekov A.D. PCR amplification on a microarray of gel-immobilized oligonucleotides: detection of bacterial toxin- and drug-resistant genes and their mutations // *Biotechniques.* 2000. V. 29, P. 844–848, 850–852.
  30. Tillib S.V., Strizhkov B.N., Mirzabekov A.D. Integration of multiple PCR amplifications and DNA mutation analyses by using oligonucleotide microchip // *Anal Biochem.* 2001. V. 292. P. 155–160.
  31. Khodakov D.A., Zakharova N.V., Gryadunov D.A., Filatov F.P., Zasedatelev A.S., Mikhailovich V.M. An oligonucleotide microarray for multiplex real-time PCR identification of HIV-1, HBV, and HCV // *Biotechniques.* 2008. V. 44. P. 241–246.
  32. Drobyshev A.L., Nasedkina T.V., Zakharova N.V. The role of DNA diffusion in solid phase polymerase chain reaction with gel-immobilized primers in planar and capillary microarray format // *Biomicrofluidics.* 2009. V. 3. P. 44112.
  33. Pemov A., Modi H., Chandler D.P., Bavykin S. DNA analysis with multiplex microarray-enhanced PCR // *Nucleic Acids Res.* 2005. V. 33. e11.
  34. Huang H., Xiao P., Qi Z., Bu Y., Liu W., Zhou G. A gel-based solid-phase amplification and its application for SNP typing and sequencing on-chip // *Analyst.* 2009. V. 134. P. 2434–2440.
  35. Bing D.H., Boles C., Rehman F.N., Audeh M., Belmarsh M., Kelley B., Adams C.P. Bridge amplification: A solid phase PCR system for the amplification and detection of allelic differences in single copy genes // In: *Genetic Identity Conference Proceeding, Seventh International Symposium on Human Identification.* Promega Corporation, 1996.
  36. Adams C.P., Kron S.J. Method for performing amplification of nucleic acid with two primers bound to a single solid support // US Patent No. 5,641,658. Jun. 24, 1997.
  37. Adessi C., Matton G., Ayala G., Turcatti G., Mermod J.J., Mayer P., Kawashima E. Solid phase DNA amplification: characterisation of primer attachment and amplification mechanisms // *Nucleic Acids Res.* 2000. V. 28. P. E87.
  38. Mitterer G., Schmidt W.M. Microarray-based detection of bacteria by on-chip PCR // *Methods Mol Biol.* 2006. V. 345. P. 37–51.
  39. Sun Y., Dhumpa R., Bang D.D., Handberg K., Wolff A. DNA microarray-based solid-phase RT-PCR for rapid detection and identification of influenza virus type A and subtypes H5 and H7 // *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2011. V. 69. P. 432–439.
  40. Sun Y., Dhumpa R., Bang D.D., Høgberg J., Handberg K., Wolff A. A lab-on-a-chip device for rapid identification of avian influenza viral RNA by solid-phase PCR // *Lab Chip.* 2011. V. 11. P. 1457–1463.
  41. Huber M., Losert D., Hiller R., Harwanegg C., Mueller M.W., Schmidt W.M. Detection of single base alterations in genomic DNA by solid phase polymerase chain reaction on oligonucleotide microarrays // *Anal Biochem.* 2001. V. 299. P. 24–30.
  42. Huber M., Mündlein A., Dornstauder E., Schneeberger C., Tempfer C.B., Mueller M.W., Schmidt W.M. Accessing single nucleotide polymorphisms in genomic DNA by direct multiplex polymerase chain reaction amplification on oligonucleotide microarrays // *Anal Biochem.* 2002. V. 303. P. 25–33.
  43. Mitterer G., Huber M., Leidinger E., Kirisits C., Lubitz W., Mueller M.W., Schmidt W.M. Microarray-based identification of bacteria in clinical samples by solid-phase PCR amplification of 23S ribosomal DNA sequences // *J. Clin. Microbiol.* 2004. V. 42. P. 1048–1057.
  44. von Nickisch-Roseneck M., Marschan X., Andresen D., Bier FF. Reverse transcription-polymerase chain reaction on a microarray: the integrating concept of «active arrays» // *Anal. Bioanal. Chem.* 2008. V. 391. P. 1671–1678.
  45. Hoffmann J., Trotter M., von Stetten F., Zengerle R., Roth G. Solid-phase PCR in a picowell array for immobilizing and arraying 100,000 PCR products to a microscope slide // *Lab Chip.* 2012. V. 12. P. 3049–3054.
  46. Mercier J.F., Slater G.W., Mayer P. Solid phase DNA amplification: a simple Monte Carlo Lattice model // *Biophys J.* 2003. V. 85. P. 2075–2086.
  47. Mercier J.F., Slater G.W. Solid phase DNA amplification: a Brownian dynamics study of crowding effects // *Biophys J.* 2005. V. 89. P. 32–42.
  48. von Nickisch-Roseneck M., Marschan X., Andresen D., Abraham A., Heise C., Bier F.F. On-chip PCR amplification of very long templates using immobilized primers on glassy surfaces // *Biosens Bioelectron.* 2005. V. 20. P. 1491–1498.
  49. Fedurco M., Romieu A., Williams S., Lawrence I., Turcatti G. BTA, a novel reagent for DNA attachment on glass and efficient generation of solid-phase amplified DNA colonies // *Nucleic Acids Res.* 2006. V. 34. e22.
  50. Hoffmann J., Hin S., von Stetten F., Zengerle R., Roth G. Universal protocol for grafting PCR primers onto various lab-on-a-chip substrates for solid-phase PCR // *RSC Adv.* 2012. V. 2. P. 3885–3889.

*Поступила в редакцию 19.11.2012 г.*