



РЕКОМБИНАЗНАЯ ПОЛИМЕРАЗНАЯ АМПЛИФИКАЦИЯ: МЕТОДОЛОГИЯ, МЕХАНИЗМЫ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ

Асадова Феруза Джума кизи

Хамраева Марджона Шавкат кизи

Самаркандский государственный медицинский университет

Аннотация. *Рекомбиназная полимеразная амплификация (RPA) представляет собой инновационную методику амплификации нуклеиновых кислот, которая сочетает в себе высокую чувствительность, скорость и возможность работы при постоянной температуре. Данная статья рассматривает основные принципы и механизмы действия RPA, включая ключевые компоненты реакции, такие как рекомбиназы, белки связывания одноцепочечных ДНК (SSB) и полимеразы. Также подробно изучаются биохимические основы метода, его преимущества и недостатки по сравнению с традиционной полимеразной цепной реакцией (ПЦР). Особое внимание уделено применению RPA в молекулярной диагностике, включая диагностику инфекционных заболеваний, выявление генетических мутаций и тестирование на устойчивость вирусов к антивирусным препаратам. RPA демонстрирует высокий потенциал для использования в клинической практике, обеспечивая точную диагностику и ускоренную обработку результатов. В заключение обсуждаются перспективы дальнейшего развития технологии и её роли в современной медицине.*

Ключевые слова: *рекомбиназная полимеразная амплификация, нуклеиновые кислоты, молекулярная диагностика, генетические мутации, ПЦР, инфекционные заболевания, амплификация, полимеразы, рекомбиназы, изотермическая амплификация.*

Введение. *Современные достижения в области молекулярной биологии и медицины требуют разработки эффективных и доступных методов для амплификации нуклеиновых кислот, которые обладают высокой*



чувствительностью, специфичностью и оперативностью. Одним из таких методов является рекомбиназная полимеразная амплификация (RPA), который представляет собой инновационную изотермическую технологию, позволяющую проводить амплификацию ДНК или РНК без использования сложного термоциклирования. Данный метод основывается на действиях рекомбиназ, белков связывания одноцепочечных ДНК (SSB) и полимераз, что значительно упрощает процесс амплификации, снижая требования к лабораторному оборудованию и увеличивая доступность технологии для различных применений [13,19].

В последние годы RPA привлекла внимание научного сообщества как альтернатива традиционной полимеразной цепной реакции (ПЦР), благодаря своим уникальным преимуществам. Среди них — высокая скорость реакции, возможность работы в реальном времени и меньшие требования к подготовке проб и реагентам. Эти характеристики делают RPA привлекательным инструментом для диагностики инфекционных заболеваний, выявления генетических мутаций, а также в исследованиях по мониторингу устойчивости вирусов к антивирусной терапии [16].

Основные компоненты реакции

Рекомбиназная полимеразная амплификация (RPA) представляет собой изотермическую методику амплификации нуклеиновых кислот, которая требует наличия нескольких ключевых компонентов, каждый из которых играет важную роль в успешной реакции. Основные компоненты реакции RPA включают рекомбиназы, белки связывания одноцепочечных ДНК (SSB), полимеразы и другие вспомогательные элементы, обеспечивающие эффективность и специфичность амплификации.

Рекомбиназы

Рекомбиназы — это ферменты, которые играют центральную роль в инициации амплификации в процессе RPA. Эти ферменты обладают способностью разрывать двуцепочечную ДНК и образовывать одноцепочечные участки, что необходимо для последующего связывания с праймерами и начала



репликации. В отличие от ПЦР, где температура изменяется для денатурации ДНК, в RPA рекомбиназы обеспечивают расплетение ДНК при постоянной температуре. Основными рекомбиназами, используемыми в RPA, являются T4 рекомбиназа и RecA, которые обеспечивают разрыв водородных связей между цепями ДНК, создавая одноцепочечные участки, на которые могут прикрепляться праймеры [22].

Белки связывания одноцепочечных ДНК (SSB)

Белки связывания одноцепочечных ДНК (SSB) — это ферменты, которые связываются с одноцепочечными участками ДНК, предотвращая их повторное образование в двуцепочечную структуру. В RPA белки SSB играют ключевую роль в стабилизации одноцепочечных ДНК, препятствуя их деградации и обеспечивая правильное направление амплификации. Белки SSB также способствуют оптимизации взаимодействия праймеров с одноцепочечными молекулами ДНК, что существенно увеличивает эффективность и специфичность реакции [17].

Полимеразы

Полимеразы являются основным компонентом, отвечающим за синтез новой цепи ДНК. В RPA используются термостабильные полимеразы, такие как Bst полимеразы, которая активно работает при температуре 37-42°C, что позволяет реакции протекать без необходимости в термоциклировании. Полимераза синтезирует новые цепи ДНК, начиная с праймеров, которые связываются с одноцепочечными участками ДНК. Важно, что полимеразы в RPA могут работать на одноцепочечных молекулах ДНК, что отличает этот метод от традиционной ПЦР, где используется двойная цепь для репликации [8].

Праймеры

Праймеры являются короткими олигонуклеотидными последовательностями, которые связываются с одноцепочечными участками ДНК, обеспечивая начало синтеза новой цепи. В отличие от ПЦР, где обычно используются два праймера для амплификации, в RPA могут использоваться



два набора праймеров для каждого из направлений репликации, что увеличивает эффективность реакции. Праймеры должны быть специфичны к целевой последовательности, чтобы минимизировать возможность неспецифического амплифицирования [6].

Другие компоненты

В дополнение к основным компонентам, RPA требует наличия вспомогательных веществ, таких как буферные растворы, которые поддерживают оптимальные условия для работы ферментов, а также молекул, обеспечивающих стабильность реакции, таких как дНТФ. В некоторых случаях могут использоваться дополнительные компоненты, такие как кофакторы, усиливающие активность полимеразы или другие ферменты, необходимые для поддержки и усиления амплификации.

Таким образом, эффективная рекомбиназная полимеразная амплификация требует комплексного взаимодействия нескольких ферментов и вспомогательных компонентов, каждый из которых играет свою роль в обеспечении высокой скорости и специфичности амплификации нуклеиновых кислот при изотермических условиях.

Протокол выполнения RPA

Рекомбиназная полимеразная амплификация (RPA) представляет собой изотермический метод амплификации, требующий строго регламентированного протокола для обеспечения точных и воспроизводимых результатов. Протокол RPA включает несколько ключевых этапов, таких как подготовка реагентов, запуск реакции и анализ полученных продуктов.

Первоначально необходимо подготовить компоненты для реакции. Включаемые в протокол ферменты, такие как рекомбиназы (например, T4 рекомбиназа или RecA), играют важную роль в разрыве двуцепочечной ДНК и образовании одноцепочечных фрагментов. Белки связывания одноцепочечных ДНК (SSB) предотвращают повторное связывание этих фрагментов, в то время как полимеразы, например Bst полимеразы, синтезируют новые цепи ДНК. Важными компонентами также являются праймеры, специфичные для целевой



последовательности, ДНК-шаблон и дНТПs, используемые для синтеза новой цепи. Буферный раствор поддерживает оптимальные условия для работы ферментов [10].

После подготовки реагентов следует составление смеси для амплификации, в которую входят все необходимые компоненты с установленными концентрациями. Затем смесь инкубируется при оптимальной температуре (обычно 37-42°C) в течение 20-60 минут, в течение которых рекомбиназы и полимеразы инициируют амплификацию ДНК [26].

После завершения амплификации реакцию можно остановить, добавив стоп-реагент или охлаждая смесь до низкой температуры. Для анализа продуктов RPA используют методы, такие как агарозный гель-электрофорез, флуоресцентные датчики для мониторинга реакции в реальном времени или ПЦР для подтверждения результатов [3].

Процесс инициации амплификации

Процесс инициации амплификации в рекомбиназной полимеразной амплификации (RPA) является ключевым этапом, на котором начинается разворачивание молекулы ДНК и подготовка её к репликации. Этот этап включает в себя несколько важных биохимических процессов, которые обеспечивают стабильное начало амплификации при изотермических условиях.

Активизация рекомбиназы

Первоначально, рекомбиназы, такие как T4 рекомбиназа или RecA, активируются в присутствии магнийсодержащего буферного раствора. Эти ферменты обеспечивают разрыв двуцепочечной ДНК, создавая одноцепочечные участки. Этот процесс необходим для того, чтобы одноцепочечная ДНК могла взаимодействовать с праймерами и начать репликацию. Рекомбиназы работают путем разрыва водородных связей между двумя цепями ДНК, что позволяет разделить молекулу на одноцепочечные фрагменты.

Формирование одноцепочечных участков ДНК



После разрыва двуцепочечной структуры, образуются одноцепочечные участки ДНК, которые являются мишенью для дальнейших стадий амплификации. Эти одноцепочечные фрагменты стабилизируются с помощью белков связывания одноцепочечных ДНК (SSB). SSB белки связываются с одноцепочечными участками, предотвращая их повторное образование двуцепочечной ДНК и сохраняя их доступность для дальнейших этапов реакции.

Связывание праймеров с одноцепочечными участками

Следующий шаг в инициации — это связывание специфических праймеров с одноцепочечными участками ДНК. Праймеры, представляющие собой короткие олигонуклеотиды, комплементарны целевой области ДНК. В отличие от традиционной ПЦР, где праймеры связываются с двуцепочечной молекулой ДНК, в RPA праймеры связываются с одноцепочечными участками, что ускоряет и упрощает этот процесс.

Запуск репликации с помощью полимеразы

После связывания праймеров начинается синтез новой цепи ДНК с помощью полимеразы. В RPA используется термостабильная полимеразы, такая как Bst полимеразы, которая работает при температуре около 37-42°C, не требуя термоциклирования. Полимераза начинает репликацию с праймеров, используя дНТФс (дезоксинуклеозидтрифосфаты) в качестве строительных блоков для синтеза новой цепи.

Участие других вспомогательных факторов

Кроме рекомбиназ, белков связывания одноцепочечных ДНК и полимеразы, процесс инициации также может требовать присутствия дополнительных вспомогательных факторов. Эти факторы могут включать коферменты, которые активируют или стабилизируют полимеразу, или буферные компоненты, которые обеспечивают оптимальные условия для действия ферментов. В некоторых случаях могут быть добавлены дополнительные факторы, усиливающие активность рекомбиназ или полимераз, что улучшает эффективность реакции.



Роль температуры и времени

Процесс инициации амплификации в RPA протекает при постоянной температуре, обычно в пределах 37-42°C, что отличает этот метод от термоциклирования в ПЦР. Это изотермическое условие позволяет избежать циклических изменений температуры, упрощая процесс амплификации и уменьшая требования к оборудованию. Время инкубации обычно составляет от 20 до 60 минут в зависимости от длины целевой последовательности и используемых праймеров.

Инициация амплификации является критическим этапом, от которого зависит успех всей реакции. Правильная подготовка шаблона ДНК, выбор праймеров и оптимизация условий реакции в сочетании с эффективной работой рекомбиназ и полимераз являются важными факторами для достижения высококачественных и воспроизводимых результатов в RPA [3,4,11].

Репликация ДНК при помощи полимеразы

Репликация ДНК при помощи полимеразы является центральным этапом в процессе рекомбиназной полимеразной амплификации (RPA). На этом этапе происходит синтез новой цепи ДНК на основе одноцепочечной матрицы, созданной в процессе инициации амплификации. Полимераза использует матрицу, обеспечивая точность и эффективность репликации, что приводит к увеличению количества целевой последовательности ДНК.

Механизм репликации с использованием полимеразы

После того как праймеры связываются с одноцепочечными участками ДНК, полимеразы начинают процесс синтеза новой цепи ДНК. Процесс репликации происходит следующим образом:

- **Присоединение полимеразы:** После того как праймер связывается с одноцепочечным участком матрицы, полимеразы, такая как термостабильная Bst полимеразы, присоединяется к праймеру и начинает синтезировать новую цепь ДНК.
- **Синтез новой цепи:** Полимераза добавляет дНТФс (дезоксинуклеозидтрифосфаты) к растущей цепи ДНК, используя



одноцепочечную матрицу в качестве шаблона. Полимераза добавляет нуклеотиды к 3' концу праймера, синтезируя новую цепь в 5' → 3' направлении.

- **Прогрессия репликации:** Полимераза движется вдоль матрицы, добавляя нуклеотиды и увеличивая длину синтезируемой цепи. При этом синтез происходит непрерывно, и полимераза продолжает репликацию до тех пор, пока не достигнет конца целевой области или не встретит стоп-сигнал.

Замещение праймеров

Во время репликации полимераза не только синтезирует новую цепь, но и замещает праймеры на матрице, что является важной особенностью RPA. Процесс замещения праймеров необходим для того, чтобы обеспечить непрерывную репликацию без ошибок. В RPA рекомбиназа действует на одном из одноцепочечных фрагментов, создавая дополнительные участки, где могут связываться новые праймеры, что позволяет продолжить амплификацию.

Факторы, влияющие на эффективность репликации

Эффективность репликации в методе рекомбиназной полимеразной амплификации (RPA) зависит от нескольких ключевых факторов.

Во-первых, важным параметром является температура реакции. RPA проводится при изотермических условиях, обычно в пределах 37-42°C. Температура должна быть оптимальной для активности полимеразы: слишком низкая температура может замедлить процесс амплификации, в то время как высокая температура может привести к инактивации полимеразы, что существенно снизит эффективность реакции.

Во-вторых, концентрация дезоксинуклеозидтрифосфатов (дНТФс) играет значительную роль. Для нормального протекания репликации необходимо поддержание достаточной концентрации всех четырех дезоксинуклеозидтрифосфатов (dATP, dTTP, dGTP, dCTP). Недостаток этих веществ может замедлить процесс синтеза ДНК или вызвать дефицит нуклеотидов, что приведет к снижению качества амплификации.

Третьим важным фактором является качество и специфичность праймеров. Праймеры должны быть специфичными для целевой



последовательности и иметь оптимальную длину, обычно от 18 до 30 нуклеотидов. Это необходимо для того, чтобы избежать образования неспецифических продуктов амплификации, что могло бы исказить результаты реакции.

Наконец, выбор полимеразы также критичен для успеха РРА. Используемая полимеразы должна быть активной при выбранной температуре. Например, полимеразы Bst обладает высокой термостабильностью и активностью при изотермических условиях, что делает её наиболее подходящей для проведения РРА.

Прогрессия амплификации

В результате репликации каждая молекула ДНК служит шаблоном для создания двух новых молекул — одна будет одноцепочечной, а другая — двуцепочечной. Этот процесс усиливается с каждым циклом, и за короткое время можно получить миллионы копий целевой последовательности. Репликация продолжается до тех пор, пока не завершится амплификация целевой области.

Роль полимеразы в поддержании специфичности амплификации

Особенностью РРА является высокая специфичность репликации. Полимераза не только синтезирует новую цепь ДНК, но и предотвращает ошибочное присоединение неправильных нуклеотидов, что минимизирует вероятность образования неспецифических продуктов. Специфичность амплификации также обеспечивается высокой точностью связывания праймеров с целевой последовательностью, что увеличивает чувствительность и эффективность РРА [9,20,21].

Изотермическая амплификация как альтернатива термоциклированию

Изотермическая амплификация представляет собой метод амплификации нуклеиновых кислот, который проводится при постоянной температуре, в отличие от традиционного метода полимеразной цепной реакции (ПЦР), где требуется использование термоциклирования. Этот подход



значительно упрощает процесс амплификации и предоставляет ряд преимуществ, особенно в области диагностики и других молекулярных применений.

Принцип изотермической амплификации

Изотермическая амплификация основывается на использовании термостабильных ферментов, таких как полимеразы и рекомбиназы, которые могут функционировать при постоянной температуре (обычно 37-42°C). В отличие от ПЦР, где для инициации, денатурации и элонгации ДНК требуется несколько циклов изменения температуры, изотермическая амплификация не требует таких температурных колебаний. Это позволяет проводить амплификацию в одном термостатическом блоке без использования сложных термоциклеров, что делает метод более доступным и удобным.

Преимущества изотермической амплификации

Изотермическая амплификация, включая метод RPA, предлагает несколько ключевых преимуществ. Она упрощает оборудование, исключая необходимость в термоциклере, что позволяет использовать более компактные и доступные приборы, например, портативные термостаты. Это снижает стоимость анализа и делает метод доступным для широкого круга пользователей. Процесс амплификации также значительно ускоряется, с получением результатов за 15-30 минут, что значительно быстрее, чем традиционная ПЦР. Метод обладает высокой чувствительностью и специфичностью благодаря использованию рекомбиназ и термостабильных полимераз.

Механизм изотермической амплификации включает использование рекомбиназ для разрыва двуцепочечной ДНК, полимераз для синтеза новой цепи ДНК при постоянной температуре, а также белков связывания одноцепочечных ДНК, которые стабилизируют одноцепочечные фрагменты, обеспечивая их дальнейшую амплификацию.

Сравнение с ПЦР



Одним из ключевых различий между изотермической амплификацией и ПЦР является отсутствие необходимости в циклических изменениях температуры. В ПЦР для каждого цикла требуется повышение температуры для денатурации ДНК, охлаждение для связывания праймеров и нагревание для синтеза новой цепи ДНК. В изотермической амплификации все эти процессы происходят при постоянной температуре, что позволяет значительно упростить процедуру.

Преимущества изотермической амплификации также включают повышение стабильности реакции при использовании термостабильных ферментов и улучшение скорости амплификации, что делает этот метод более привлекательным для клинической диагностики и полевых исследований, где быстрая и точная диагностика крайне важна.

Применения изотермической амплификации

Изотермическая амплификация, благодаря своей простоте и скорости, находит широкое применение в различных областях. Она используется для диагностики инфекционных заболеваний, выявления генетических мутаций, а также для определения различных биологических маркеров. Этот метод активно применяется в молекулярной биологии и в сфере биомедицины, где требования к скорости и доступности являются критическими [3].

Сравнительный анализ скорости, чувствительности и специфичности

Сравнительный анализ методов амплификации нуклеиновых кислот, включая рекомбиназную полимеразную амплификацию (RPA) и традиционную полимеразную цепную реакцию (ПЦР), является важным этапом для оценки их применимости в различных областях, таких как диагностика заболеваний, генетические исследования и молекулярные биологические исследования. Ключевыми параметрами для этого сравнения являются скорость, чувствительность и специфичность.

Скорость амплификации



Одним из основных преимуществ RPA является его высокая скорость. В отличие от ПЦР, где требуется несколько циклов температурных изменений (денатурация, отжиг и удлинение), RPA осуществляется при постоянной температуре (обычно 37–42°C), что исключает необходимость в сложном термоциклировании. Из-за этого весь процесс амплификации в RPA может быть завершен за 15–30 минут, что значительно быстрее, чем в традиционной ПЦР, где время одного цикла составляет несколько минут, а общая продолжительность реакции может варьироваться от 1 до 3 часов в зависимости от используемой системы [15].

Это делает RPA более подходящей для экстренных ситуаций, когда необходимо получить результаты в кратчайшие сроки. Такие характеристики как высокая скорость и способность проводить амплификацию при стабильной температуре делают RPA идеальным выбором для диагностических лабораторий, где требуется быстрый результат.

Чувствительность

Чувствительность метода определяет его способность обнаруживать даже низкие концентрации целевого материала (нуклеиновых кислот) в образце. RPA характеризуется высокой чувствительностью, сравнимой с ПЦР, благодаря использованию рекомбиназ и термостабильных полимераз, которые эффективно обеспечивают амплификацию даже при низком содержании ДНК. В некоторых случаях, благодаря отсутствию сложных термоциклирования и повышенной стабильности реакции, RPA может проявлять даже большую чувствительность в определенных условиях [19].

ПЦР также обладает высокой чувствительностью, особенно в случае использования современных технологий и адаптации метода (например, в реальном времени ПЦР), однако из-за потребности в термоциклировании этот метод может быть более чувствителен к изменениям температурных условий, что может сказаться на общей эффективности при работе с образцами низкой концентрации.

Специфичность

Специфичность метода амплификации определяет его способность избирательно амплифицировать только целевой фрагмент ДНК, минимизируя вероятность ложных результатов, связанных с амплификацией неспецифических участков. RPA демонстрирует высокую специфичность благодаря использованию специально подобранных праймеров и рекомбиназ, которые обеспечивают точную индукцию амплификации только в пределах целевого участка. Этот механизм предотвращает нежелательное связывание и амплификацию неполных или несоответствующих фрагментов ДНК [1].

ПЦР также обладает высокой специфичностью, которая зависит от точности праймеров и термоциклирования. Однако, в случае с ПЦР, при плохом контроле температуры и времени отжига праймеров могут возникать проблемы с неспецифическими амплификациями. В этом контексте RPA может обеспечить более стабильные результаты при менее строгих условиях терморегуляции.

Таблица 1. Резюме сравнительного анализа RPA и ПЦР

Параметр	RPA	ПЦР
Скорость	15–30 минут	1–3 часа (в зависимости от метода)
Чувствительность	Высокая	Высокая, особенно при реальном времени
Специфичность	Высокая (меньше зависит от термошоков)	Высокая, но может зависеть от температуры

- **Скорость:** RPA выигрывает за счет исключения термоциклирования.



- **Чувствительность:** Оба метода обладают высокой чувствительностью, но RPA может продемонстрировать большую эффективность в условиях низких концентраций.

- **Специфичность:** RPA, благодаря своей методологии, может быть более стабильным в плане предотвращения ложных результатов, в то время как ПЦР требует более строгого контроля условий амплификации.

Несмотря на многочисленные преимущества, RPA имеет и некоторые ограничения. В частности, метод может столкнуться с проблемами специфичности при работе с сложными или загрязненными образцами, требуя оптимизации условий реакции. Также для выполнения RPA необходимо использование дополнительных компонентов, таких как рекомбиназы и белки связывания одноцепочечных ДНК (SSB), что повышает сложность протокола. Проблемы могут возникать при работе с высококонцентрированными образцами, а также в случае автоматизации процесса для больших объемов. Наконец, RPA, как и ПЦР, чувствителен к внешним загрязнениям, что требует строгого контроля условий проведения экспериментов [2,14,21].

Применение RPA

Рекомбиназная полимеразная амплификация (RPA) является высокоэффективным методом для амплификации нуклеиновых кислот и находит широкое применение в различных областях науки и медицины. Его способность быстро и эффективно амплифицировать ДНК или РНК при изотермических условиях делает его особенно полезным в диагностике и молекулярных исследованиях.

Диагностика инфекционных заболеваний

Одним из наиболее популярных применений RPA является диагностика инфекционных заболеваний. RPA позволяет оперативно и с высокой чувствительностью обнаруживать патогенные микроорганизмы в образцах биологических жидкостей или тканевых материалах. Метод применяется для выявления бактериальных, вирусных и грибковых инфекций, таких как



туберкулез, ВИЧ, гепатит, а также инфекции, вызванные бактериями, устойчивыми к антибиотикам.

Преимущества RPA в этой области заключаются в его скорости и изотермической природе, что позволяет проводить диагностику без необходимости использования сложного и дорогого оборудования. Это особенно важно в условиях экстренных медицинских ситуаций, в сельских и удаленных районах, где стандартное оборудование, требующее термоциклирования, может быть недоступно. Благодаря быстрому времени получения результатов, RPA может сыграть решающую роль в своевременной диагностике и выборе терапевтических стратегий [7].

Выявление генетических мутаций

RPA также применяется для выявления генетических мутаций, что делает его незаменимым инструментом в области генетической диагностики и исследования заболеваний, ассоциированных с наследственными патологиями. С его помощью можно проводить диагностику мутаций в генах, связанных с наследственными заболеваниями, такими как муковисцидоз, серповидноклеточная анемия, наследственные формы рака и другие генетические расстройства.

Кроме того, RPA может быть использован для выявления соматических мутаций, характерных для некоторых видов рака. Это позволяет не только диагностировать рак на ранних стадиях, но и прогнозировать развитие заболевания, что важно для персонализированной медицины и выбора наиболее эффективных методов лечения [12].

Мониторинг вирусных инфекций и эпидемиологических исследований

Важной областью применения RPA является мониторинг вирусных инфекций, таких как COVID-19. RPA позволяет быстро и точно выявлять присутствие вирусного генома в образцах пациента, что может быть решающим для оперативного принятия мер, направленных на ограничение распространения вируса. Это особенно важно в условиях пандемий, когда необходимо проводить массовые тестирования с высокой скоростью.



Кроме того, RPA используется для эпидемиологических исследований, где требуется мониторинг распространения инфекционных заболеваний в реальном времени. Из-за своей высокой чувствительности и скорости, этот метод идеально подходит для выявления вирусов в первых стадиях заболевания, а также для отслеживания изменения вирусных штаммов [5].

Применение в биотехнологиях и экологических исследованиях

RPA также находит применение в биотехнологии, где используется для контроля качества продуктов и производственных процессов. Метод позволяет детектировать генетические изменения в микроорганизмах, которые могут быть полезны для улучшения технологических процессов, таких как производство ферментов, биотоплива или других биопродуктов.

В экологических исследованиях RPA помогает выявлять загрязнители, такие как патогенные микроорганизмы или генетически модифицированные организмы (ГМО), в окружающей среде. Это дает возможность не только осуществлять мониторинг состояния экосистем, но и разрабатывать меры по их защите и улучшению [23].

Применение в судебной медицине

RPA находит также широкое применение в судебной медицине для анализа образцов ДНК, полученных с места преступления, а также для проведения paternity тестов и идентификации личности. Благодаря своей чувствительности и скорости RPA может использоваться для обработки образцов, таких как кровь, слюна, волосы и другие биологические материалы, при этом не требуя сложного оборудования [25].

Заключение

Рекомбиназная полимеразная амплификация (RPA) представляет собой современный и высокоэффективный метод амплификации нуклеиновых кислот, который находит широкое применение в различных областях медицины, биотехнологии, экологии и судебной экспертизе. Благодаря своей изотермичности, высокой чувствительности и скорости выполнения, RPA становится важным инструментом для диагностики инфекционных



заболеваний, выявления генетических мутаций, мониторинга вирусных инфекций и экологических исследований.

Преимущества метода, такие как отсутствие необходимости в термоциклировании, минимальные требования к оборудованию и высокая скорость получения результатов, делают RPA незаменимым в условиях ограниченных лабораторных возможностей и экстренных ситуаций. В то же время, несмотря на свои достоинства, метод имеет определенные ограничения, такие как чувствительность к загрязнению и возможность неспецифической амплификации в сложных образцах.

Таким образом, RPA представляет собой перспективную альтернативу традиционным методам амплификации, таким как ПЦР, и продолжает развиваться, предлагая новые возможности для диагностики и молекулярных исследований. В будущем метод может быть совершенствован для повышения его специфичности, чувствительности и применения в более широком круге научных и медицинских задач.

ЛИТЕРАТУРА

1. Abd El Wahed A. et al. Recombinase polymerase amplification assay for rapid diagnostics of dengue infection //PloS one. – 2015. – Т. 10. – №. 6. – С. e0129682.
2. Bhat A. I. et al. Recombinase Polymerase Amplification. – 2020.
3. Daher R. K. et al. Recombinase polymerase amplification for diagnostic applications //Clinical chemistry. – 2016. – Т. 62. – №. 7. – С. 947-958.
4. Euler M. et al. Development of a panel of recombinase polymerase amplification assays for detection of biothreat agents //Journal of clinical microbiology. – 2013. – Т. 51. – №. 4. – С. 1110-1117.
5. Fan X. et al. Clinical validation of two recombinase-based isothermal amplification assays (RPA/RAA) for the rapid detection of African swine fever virus //Frontiers in Microbiology. – 2020. – Т. 11. – С. 1696.
6. Huang Q. et al. Establishment of a real-time Recombinase Polymerase Amplification (RPA) for the detection of decapod iridescent virus 1 (DIV1) //Journal of Virological Methods. – 2022. – Т. 300. – С. 114377.



7. James A., Macdonald J. Recombinase polymerase amplification: Emergence as a critical molecular technology for rapid, low-resource diagnostics //Expert review of molecular diagnostics. – 2015. – T. 15. – №. 11. – C. 1475-1489.
8. Juma K. M. et al. Recombinase polymerase amplification using novel thermostable strand-displacing DNA polymerases from *Aeribacillus pallidus* and *Geobacillus zalihae* //Journal of bioscience and bioengineering. – 2023. – T. 135. – №. 4. – C. 282-290.
9. Li J., Macdonald J., Von Stetten F. A comprehensive summary of a decade development of the recombinase polymerase amplification //Analyst. – 2019. – T. 144. – №. 1. – C. 31-67.
10. Lobato I. M., O'Sullivan C. K. Recombinase polymerase amplification: Basics, applications and recent advances //Trac Trends in analytical chemistry. – 2018. – T. 98. – C. 19-35.
11. Lv R. et al. Recombinase polymerase amplification for rapid detection of zoonotic pathogens: an overview //Zoonoses. – 2022. – T. 2. – №. 1.
12. Martorell S. et al. Blocked recombinase polymerase amplification for mutation analysis of PIK3CA gene //Analytical biochemistry. – 2018. – T. 544. – C. 49-56.
13. Mota D. S. et al. Recombinase polymerase amplification in the molecular diagnosis of microbiological targets and its applications //Canadian Journal of Microbiology. – 2022. – T. 68. – №. 6. – C. 383-402.
14. Raja B. et al. Development of a panel of recombinase polymerase amplification assays for detection of common bacterial urinary tract infection pathogens //Journal of applied microbiology. – 2017. – T. 123. – №. 2. – C. 544-555.
15. Rasni W. H. N. W., Yahaya N., Rehan M. M. Recombinase polymerase amplification and their application in phytopathogen detection //Malaysian Journal of Science Health & Technology. – 2022. – T. 8. – №. 2. – C. 14-24.
16. Salazar A. et al. Recombinase polymerase amplification (RPA) with lateral flow detection for three *Anaplasma* species of importance to livestock health //Scientific Reports. – 2021. – T. 11. – №. 1. – C. 15962.



17. Schaub J. M. Single-Molecule Studies of Single-Stranded DNA Binding Proteins Involved in DNA Repair. – The University of Texas at Austin, 2021.
18. Shi Y. et al. Research progress in recombinase polymerase amplification (RPA). – 2020.
19. Tan M. et al. Recent advances in recombinase polymerase amplification: Principle, advantages, disadvantages and applications //Frontiers in cellular and infection microbiology. – 2022. – T. 12. – C. 1019071.
20. WB Z. et al. Recombinase polymerase amplification and its applications in parasite detection //Zhongguo ji Sheng Chong xue yu ji Sheng Chong Bing za zhi= Chinese Journal of Parasitology & Parasitic Diseases. – 2015. – T. 33. – №. 5. – C. 382-386.
21. Zaghoul H., El-Shahat M. Recombinase polymerase amplification as a promising tool in hepatitis C virus diagnosis //World Journal of Hepatology. – 2014. – T. 6. – №. 12. – C. 916.
22. Zhang N. et al. Overview and future perspectives of microfluidic digital recombinase polymerase amplification (dRPA) //Critical Reviews in Analytical Chemistry. – 2022. – T. 52. – №. 8. – C. 1969-1989.
23. Zhao Y. et al. Application of recombinase polymerase amplification with lateral flow assay to pathogen point-of-care diagnosis //Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. – 2024. – T. 14. – C. 1475922.
24. Zhao Y. et al. Isothermal amplification of nucleic acids //Chemical reviews. – 2015. – T. 115. – №. 22. – C. 12491-12545.
25. Zheng Y. et al. Development of specific and rapid detection of human DNA by recombinase polymerase amplification assay for forensic analysis //Forensic Science International: Genetics. – 2023. – T. 66. – C. 102903.
26. Zou Y., Mason M. G., Botella J. R. Evaluation and improvement of isothermal amplification methods for point-of-need plant disease diagnostics //PloS one. – 2020. – T. 15. – №. 6. – C. e0235216.