



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 577.218

doi: 10.17308/sorpchrom.2023.23/11152

Разработка эффективного метода очистки ДНК при бисульфитной конверсии с использованием оксида кремния в качестве сорбента

Галина Борисовна Анохина¹,

Александр Юрьевич Селиванов¹, Артём Сергеевич Грязев¹,

Александр Трофимович Епринцев¹✉, Оксана Евгеньевна Чухлебова¹

¹Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия, bc366@bio.vsu.ru✉

Аннотация. Метилирование ДНК – один из самых изученных механизмов эпигенетической регуляции генома, который контролирует экспрессию генов растений и животных. Разработка эффективных методов анализа метильного статуса генов имеет огромное значение, так как обработка ДНК бисульфитом натрия – многоэтапный и трудоемкий процесс, в котором недопустимы большие потери целевого продукта. Именно поэтому чистота модифицированной ДНК играет решающую роль в последующем процессе амплификации. Наличие в исследуемых образцах высоких концентраций различных солей и примесей способно ингибировать полимеразную активность ДНК-полимеразы. В типичных протоколах, описывающих методику конверсии ДНК бисульфитом натрия, для очистки модифицированной ДНК используют коммерческие наборы, однако их применение нередко приводит к большим потерям целевого продукта, что существенно снижает эффективность процесса очистки. Кроме того, в условиях большого объема анализируемых образцов применение коммерческих наборов существенно повышает стоимость работ. В рамках исследования разработан эффективный, простой и недорогой способ очистки модифицированной ДНК от солей путём сорбции на диоксид кремния (SiO₂). Применение в качестве сорбента мелкодисперсного диоксида кремния обусловлено его способностью селективно связываться с молекулами отрицательно заряженной ДНК. Анализ конвертированной и очищенной ДНК методом электрофореза в 2% агарозном геле позволил установить, что потери целевого продукта в ходе многостадийной обработки бисульфитом натрия составили порядка 33%. Проведение метил-специфичной ПЦР с использованием праймеров к отдельным CpG-динуклеотидам в составе промотора гена GDH2 глутаматдегидрогеназы кукурузы (*Zea mays L.*) отмечено, что полученные ампликоны соответствовали теоретическому размеру – 175 п.н., 203 п.н. и 275 п.н. к первому, второму и третьему анализируемому CpG-динуклеотиду, соответственно. В связи с этим, можно утверждать, что конвертированная и сорбированная на диоксид кремния матрица пригодна для анализа метильного статуса ДНК.

Ключевые слова: эпигенетика, метилирование, ДНК, очистка, бисульфит натрия, метил-специфичная ПЦР

Благодарности: работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2023-2025 годы, проект № FZGU-2023-0009

Для цитирования: Анохина Г.Б., Селиванов А.Ю., Грязев А.С., Епринцев А.Т., Чухлебова О.Е. Разработка эффективного метода очистки ДНК при бисульфитной конверсии с использованием оксида кремния в качестве сорбента // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2023. Т. 23, № 2. С. 290-298. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2023.23/11152>

Original article

Development of an effective method for DNA purification during bisulphite conversion using silicon oxide as a sorbent

Galina B. Anokhina¹, Alexander Yu. Selivanov¹, Artem S. Gryazev¹,



Alexander T. Eprintsev¹✉, Oksana E. Chukhlebova¹

¹Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, bc366@bio.vsu.ru ✉

Abstract. DNA methylation is one of the most studied mechanisms of epigenetic regulation of the genome, which controls gene expression in plants and animals. The development of effective methods for analysing the methyl status of genes is of great importance, since DNA treatment with sodium bisulphite is a multi-stage and labour-intensive process in which significant losses of the target product are unacceptable. The purity of the modified DNA plays a decisive role in the subsequent amplification process. The presence of high concentrations of various salts and impurities in the studied samples can inhibit the polymerase activity of DNA polymerase. In typical protocols describing the method of DNA conversion with sodium bisulphite, commercial kits are used for the purification of modified DNA, but their use often leads to large losses of the target product, which significantly reduces the efficiency of the purification process. In addition, due to large volume of analysed samples, the use of commercial kits significantly increases the cost of work. As part of the study, an effective, simple and inexpensive method was developed for purification of modified DNA from salts by sorption on silicon dioxide (SiO₂). The use of finely dispersed silicon dioxide as a sorbent is due to its ability to selectively bind negatively charged DNA molecules. Analysis of the converted and purified DNA by electrophoresis in 2% agarose gel allowed to establish that the loss of the target product during the multistage treatment with sodium bisulphite was about 33%. The methyl-specific PCR using primers to individual CpG dinucleotides in the promoter of the *GDH2* gene of maize (*Zea mays* L.) glutamate dehydrogenase demonstrated that the obtained amplicons corresponded to the theoretical size – 175 bp, 203 bp and 275 bp to the first, second and third analysed CpG dinucleotide, respectively. Therefore, it was shown that the matrix converted and adsorbed on silicon dioxide is suitable for the analysis of the DNA methyl status.

Keywords: DNA methylation, purification, sodium bisulphite, methyl-specific PCR.

Acknowledgments: this work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation as part of a state order for universities in the field of scientific activity for 2023-2025, project no. FZGU-2023-0009

For citation: Anokhina G.B., Selivanov A.Yu., Gryazev A.S., Eprintsev A.T., Chukhlebova O.E. Development of an effective method for DNA purification during bisulphite conversion using silicon oxide as a sorbent. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2023. 23(2): 290-298. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2023.23/11152>

Введение

Метилирование ДНК – один из вариантов эпигенетической регуляции работы генома эукариотической клетки, которое в своем «классическом» варианте представляет собой ковалентное присоединение метильной группы в 5'-положение цитозинового основания. Данный процесс осуществляется посредством функционирования ДНК-метилтрансфераз, которые специфически присоединяют СН₃-группу к CpG-динуклеотидам, входящим в состав гена, образуя 5-метилцитозин и поддерживая паттерн метилирования ДНК в геноме. CpG-динуклеотиды представляют собой располагающиеся рядом цитозин и гуанин, разделенные фосфатом (5'-C-phosphate-G-3'). Скопления CpG-динуклеотидов в составе молекулы ДНК образуют CpG-островки [1]. Увеличение степени метилирования ДНК – промоторных областей в телах генов

приводит к снижению или полному подавлению экспрессии этих генов, в то время как снижение доли метилированных цитозинов наоборот приводит к увеличению/ индукции их транскрипционной активности. Метилирование ДНК способствует изменению пространственной структуры хроматина, приводя к компактизации хроматина, тем самым препятствуя экспрессии гена [2].

Метилирование ДНК животных организмов преимущественно затрагивает симметричные CpG-динуклеотиды и метилирование по сайтам CpNpG (где N – это А, Т или С) и CpNpN практически не встречается. Для растительных организмов, метилирование в районах CpG-островков тоже является доминирующим, однако метилирование CpNpG и CpNpN – участков встречается довольно часто. Имеются данные, что около 30% всего

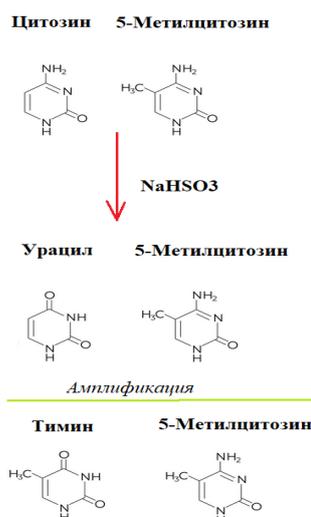


Рис. 1 Схема бисульфитной конверсии
Fig. 1 Scheme of bisulphite conversion

эпигенома гексаплоидной пшеницы метилировано по сайтам CpNpG[3].

В настоящее время в качестве основного способа исследования метильного статуса генома эукариотической клетки применяют бисульфитную конверсию ДНК. Принципиальная основа метода заключается в обработке ДНК бисульфитом натрия (NaHSO_3), в результате чего неметилированный цитозин дезаминируется с образованием урацила (рис.1). Урацил в составе ДНК, при последующей амплификации, распознается ДНК-зависимой ДНК-полимеразой как тимин. При этом, цитозин, связанный с CH_3 -группой, остается в неизменном состоянии. На основании этого было разработано несколько методов, позволяющих оценить метильный статус как отдельных CpG-динуклеотидов, так и целого генома [4].

Анализ современных методик бисульфитной конверсии

Метил-специфичная ПЦР. Метод метил-специфичной ПЦР позволяет исследовать изменение метильного статуса отдельных CpG-динуклеотидов в динамике. Принцип метода заключается в предварительном анализе отдельных участков гена на наличие CpG-островков, а в случае растительных организмов и несимметричных сайтов метилирования. Выбираются отдельные CpG-динуклеотиды,

которые будут в дальнейшем исследоваться. Именно к областям ДНК, содержащим выбранные CpG-динуклеотиды, подбираются два комплекта праймеров: М-праймеры, подобранные с учетом того, что цитозин в составе этого динуклеотида метилирован и U-праймеры, подобранные с учетом того, что цитозин находится в неметилированном состоянии. Следующим этапом исследования является проведение ПЦР по отдельности с каждым комплектом праймеров. В качестве матрицы используют ДНК, предварительно подвергнутую модификации бисульфитом натрия.

Анализ продуктов амплификации проводят методом электрофореза в 2% агарозном геле в присутствии маркера. Наличие ПЦР-продуктов в образцах, амплифицированных с М-комплексом праймеров, указывает на то, что исследуемый CpG-динуклеотид находится в метилированном состоянии. В случае, если ампликон детектировался в образцах, отжиг которых осуществлялся с U-комплексом праймеров, данный исследуемый CpG-динуклеотид был неметилирован. Преимуществом метода является возможность «точно» исследовать метильный статус выбранной области гена.

Бисульфитное секвенирование. Бисульфитное секвенирование является

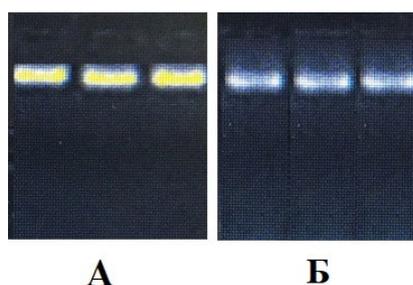


Рис. 2 Типичная электрофореграмма ДНК: А – ДНК до обработки бисульфитом натрия; Б – ДНК после обработки бисульфитом натрия
Fig. 2 Typical DNA electropherogram: A – DNA before treatment with sodium bisulphite; B – DNA after treatment with sodium bisulphite

наиболее удобным и информативным с точки зрения исследователя методом оценки степени метилирования гена. Суть метода заключается в модификации ДНК бисульфитом натрия с последующей амплификацией с одним комплектом праймеров, который подобран к областям, лишенным возможных сайтов метилирования. Полученный ампликон секвенируют. Результаты секвенирования анализируют с помощью специального программного обеспечения, которое позволяет оценить метильный статус нуклеотидов на основе сравнения исходной последовательности и полученного ампликона, синтезированного с матрицы модифицированной ДНК. Преимуществом метода является возможность исследовать достаточно большой участок ДНК.

В зависимости от целей и задач исследования применяются различные методы анализа метильного статуса ДНК. Как правило, большая часть из них предполагает проведение обработки ДНК бисульфитом натрия. При этом, данный процесс проводится в несколько этапов: денатурация ДНК, собственно бисульфитная конверсия, очистка ДНК от солей бисульфита, десульфитирование.

Важным этапом является очистка ДНК от солей бисульфита натрия, что связано в первую очередь с тем, что они могут выступать в качестве сильного ингибитора работы множества ферментов, в том числе и ДНК-зависимых ДНК-полимераз, а следовательно, и препятствовать

амплификации. Подавляющее число протоколов бисульфитной обработки предполагают использование на этапе очистки коммерческих наборов, позволяющих быстро очистить конвертированную ДНК. Однако, в данном случае, чаще всего происходят большие потери целевого продукта, что снижает эффективность процесса очистки. Кроме того, такой способ не подходит в том случае, когда объем исследуемых образцов достаточно велик, что требует больших финансовых затрат.

В связи с этим, целью исследования была разработка простого, эффективного и недорогого метода очистки ДНК, конвертированной бисульфитом натрия от солей.

Экспериментальная часть

В качестве объекта для исследования были использованы листья 14-дневной кукурузы (*Zea mays* L.), которая была выращена гидропонным способом при дневном 12 часовом свете.

Выделение ДНК. Выделение ДНК осуществлялось путем лизиса растительной ткани в буфере, содержащем: 2% ЦТАБ, 1.4 М NaCl, 20 мМ ЭДТА, 0.1 М Трис-HCl (pH 8.0) [5]. Качественный анализ выделенной ДНК осуществлялся путем проведения электрофореза в 1% агарозном геле в присутствии бромистого этидия при силе тока 50-100 мА, напряжении электрического поля 140В, продолжительность разделения фрагментов ДНК – 30 минут [6-8]. Для визуализации

использовали трансиллюминатор Serva Blue cube 300 (SERVA Electrophoresis GmbH, Германия) с длиной волны 312 нм (рис.2а).

Концентрацию ДНК определяли спектрофотометрически на приборе Evolution 260 Bio (Thermo Fisher Scientific, США) в 0.09% растворе при 260 и 320 нм. Расчёт концентрации проводился при помощи онлайн-протокола http://www.molbiol.edu.ru/protocol/10_01.html

Обработка ДНК бисульфитом натрия. Конверсия ДНК проводилась в три этапа с использованием бисульфита натрия в качестве основного модифицирующего агента [9]. На первом этапе 2 мкг ДНК денатурировали (инкубация при 55°C в присутствии 0.3М NaOH), после чего модифицировали путём добавления 500 мкл смеси 4 М раствора NaHSO₃ и 0.2 М гидрохинона с последующей инкубацией в темноте при 55°C в течение 4 часов. На третьем этапе происходила очистка модифицированной ДНК от бисульфита натрия путем сорбции на тонкодисперсной двуокиси кремния (SiO₂).

Экстракция ДНК из твёрдофазных носителей широко используется в изготовлении коммерческих наборов для выделения и очистки нуклеиновых кислот [10-12]. Принципиальной основой применения в качестве сорбента диоксида кремния является способность селективного связывания положительно заряженного SiO₂ с молекулами отрицательно заряженной ДНК. Адсорбция, зависящая от значения pH, резко уменьшалась при pH > 7.5. Связанную с носителем ДНК отмывают от различных примесей, после чего элюируют в любом низкосолевым буфере, но важно, чтобы pH был в районе 7.0-8.5 [12-13]. Необходимым условием является прогрев ДНК, сорбированной на носителе, особенно, если ДНК имеет достаточно большой размер (>5kbp). Преимуществом использования SiO₂ в качестве твёрдофазного носителя является то,

что частицы диоксида кремния слабо связывают ДНК в слабосолевых растворах (менее, чем 3М), поэтому случайное попадание сорбента в ПЦР-смесь не препятствовало амплификации.

В связи с вышеперечисленным, при разработке метода очистки ДНК, конвертированной бисульфитом натрия от солей, выбор был остановлен на использовании в качестве сорбента диоксида кремния.

Приготовление сорбента на основе двуокиси кремния. В стеклянном стакане в течение двух часов суспензировали 5 г SiO₂ (Sigma Aldrich) в 50 см³ HCl, непрерывно перемешивая, после чего трижды промывали в 50 см³ смеси метанола и соляной кислоты в соотношении 1:1, непрерывно перемешивая. Затем, в течение 3 минут отмывали диоксид кремния от кислоты в 100 см³ воды. Оставляли на 20 минут, после чего отбирали надосадочную жидкость. Стадию отмывки повторяли пять раз. Переносили в центрифужную пробирку и центрифугировали при 5000 g в течение 3 минут. Добавляли 1.5 объёма воды и перемешивали. Готовый сорбент использовали для очистки ДНК.

Очистка модифицированной ДНК. К полученным образцам модифицированной ДНК добавляли 15 мкл суспензии SiO₂, после чего тщательно перемешивали в течение 1-2 минут. Далее, к раствору приливали 2.5 объёма изопропанола и снова тщательно перемешивали. Суспензию центрифугировали при 5000 g в течение 7 минут. Надосадочную жидкость удаляли, а осадок промывали путём добавления 600 мкл 96% этанола с последующим центрифугированием в течение 1 минуты. Надосадочную жидкость удаляли и повторяли промывку 96% этанолом еще раз. Осадок промывали 80% этанолом, высушивали с открытой крышкой в течении 5-7 минут при 37°C. ДНК с частиц диоксида кремния элюировали водой.

Таблица 1. Праймеры для метил-специфичной ПЦР к гену *GDH2*

Table 1. Primers for methyl-specific PCR to the *GDH2* gene

Ген	Название	Положение цитозина		Последовательность	Размер ампликона, п.н.
<i>GDH2</i>	Прямой М	1	-304	AGATAAGTTAGTTATGG-GATGGGC	175
	Обратный М			TACGTCTTCTTAATAACCAAAC-GAA	
	Прямой U			AGATAAGTTAGTTATGG-GATGGGTG	
	Обратный U			TACATCTTCTTAATAAC-CAAACAAA	
	Прямой М	2	-263	GGTAAGTGGACGGAAAAGGA	203
	Обратный М			TACGTCTTCTTAATAACCAAAC-GAA	
	Прямой U			GGTAAGTGGATGGAAAAGGA	
	Обратный U			TACATCTTCTTAATAAC-CAAACAAA	
	Прямой М	3	-185	GGTTCGGTTTAGTTTTGAAA-TAAT	275
	Обратный М			TACGTCTTCTTAATAACCAAAC-GAA	
	Прямой U			GGTTCGGTTTAGTTTTGAAA-TAAT	
	Обратный U			TACATCTTCTTAATAAC-CAAACAAA	

Десульфонирование модифицированной ДНК осуществляли путем инкубации с 0.3 М NaOH в течение 20 минут при 37°C. Для осаждения ДНК из раствора добавляли 2 мкл раствора гликогена в концентрации 20 мг/см³, 35 мкл, 10М ацетата аммония и 3 объема 80% этанола, после чего инкубировали не менее 20 минут при -20°C. Затем, центрифугировали в течение 30 минут при 13 000 g, дважды промывали охлажденным 80% этанолом, высушивали и растворяли в воде, свободной от ДНКаз.

Обсуждение результатов

Качественный анализ обработанной ДНК при проведении электрофореза в 1% агарозном геле позволил обнаружить присутствие модифицированной ДНК на электрофореграмме (Рис. 2Б). Количественный анализ ДНК после четырех стадий бисульфитной обработки проводился спектрофотометрически на приборе Evolution 260 Bio (Thermo Fisher Scientific,

США) в 0.09% растворе при 260 и 320 нм. Установлено, что концентрация ДНК в обработанных бисульфитом образцах составляла 1 мкг. Потери ДНК в процессе всех манипуляций – 33.3%.

Для проверки пригодности полученной ДНК для анализа метильного статуса отдельных CpG-динуклеотидов проводили метил-специфичную ПЦР с использованием праймеров к гену *GDH2* глутаматдегидрогеназы кукурузы (таблица 1) с применением ScreenMix (ЗАО «Евроген», Москва). Амплификацию осуществляли на приборе Mini AMP Thermal cycler (Thermo Fisher, США) по схеме: предварительная денатурация (10 минут, 95°C), собственно амплификация (35 циклов), финальная элонгация (10 минут, 72°C). В ходе 35 циклов амплификации проводили денатурацию (30 сек, 95°C), амплификацию (30 сек, 53°C), элонгацию (30 сек, 72°C) [14].

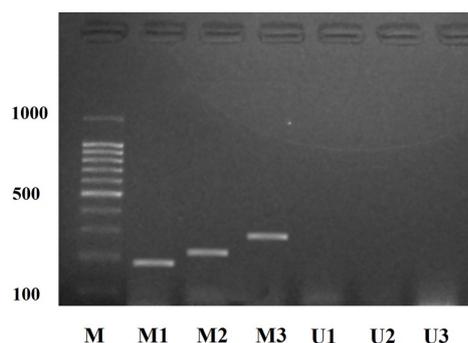


Рис. 3 Электрофореграмма ампликонов МС-ПЦР с матрицей модифицированной ДНК. М- маркер, М1- ампликон с праймерами М1 к гену GDH2; М2- ампликон с праймерами М2 к гену GDH2; М3- ампликон с праймерами М3 к гену GDH2; U1-ампликон с праймерами U1 к гену GDH2; U2- ампликон с праймерами U2 к гену GDH2; U3-ампликон с праймерами U3 к гену GDH2

Fig. 3 Electropherogram of MS-PCR amplicons with a modified DNA template. M - marker, M1 - amplicon with primers M1 to the GDH2 gene; M2 - amplicon with primers M2 to the GDH2 gene; M3 - amplicon with primers M3 to the GDH2 gene; U1 - amplicon with primers U1 to the GDH2 gene; U2 - amplicon with primers U2 to the GDH2 gene; U3 - amplicon with primers U3 to the GDH2 gene

Визуализацию ПЦР-продуктов осуществляли в 2% агарозном геле в присутствии бромистого этидия при силе тока 50-100 мА, напряжении электрического поля 140В, длительность разделения фрагментов ДНК – 30 минут [6-8]. Для визуализации использовали трансиллюминатор Serva Blue cube 300 (SERVA Electrophoresis GmbH, Германия) с длиной волны 312 нм.

Полученные ПЦР продукты соответствовали теоретическому размеру: 175 п.н., 203 п.н. и 275 п.н., соответственно, что указывает на то, что амплификация прошла успешно и очищенная ДНК пригодна к использованию в исследованиях анализа степени метилирования методом метил-специфичной ПЦР (рис. 3).

Заключение

Список литературы

1. Ashapkin V.V., Kutueva L. I., Aleksandrushkina N.I., Vanyushin B.F. Epigenetic mechanisms of plant adaptation to biotic and abiotic stresses // *International Journal of Molecular Sciences*. 2020. Vol. 21., no 20. P. 7457.
2. Vanyushin B.F., Ashapkin V.V. DNA methylation in higher plants: past, present

and future // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*. 2011. Vol. 1809, no 8. P. 360-368.- 3. Кирнос М.Д., Александрюшкина Н.И., Ванюшин Б.Ф. 5-метилцитозин в пиримидиновых последовательностях ДНК растений и животных: специфичность метилирования // *Биохимия*. 1981. Т. 46, №. 12. С. 1458-1474.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет известных финансовых конфликтов интересов или личных отношений, которые могли бы повлиять на работу, представленную в этой статье.



4. Смирнихина С.А., Лавров А.В. Методы оценки метилирования остатков цитозина в ДНК // *Молекулярная биология*. 2009. Т. 43, №. 3. С. 387-391.

5. Рябушкина Н.А., Омашева М.Е., Галиакпаров Н.Н. Специфика выделения ДНК из растительных объектов // *Биотехнология. Теория и практика*. 2012. №. 2. С. 9-26.

6. Епринцев А.Т., Попов В.Н., Федорин Д.Н. Идентификация и исследование экспрессии генов. Воронеж: Изд-во Воронеж. ун-та. 2008. 63 с.

7. Селеменев В.Ф., Рудакова Л.В., Рудаков О.Б., Беланова Н.А., Назарова А.А. Фосфолипиды на фоне природных матриц. Воронеж: Научная книга. 2020. 318 с.

8. Селеменев В. Ф., Рудаков О. Б., Славинская Г.В., Дроздова Н.В. Пигменты пищевых производств (Меланоидины). М: Дели принт. 2008. 246 с.

9. Hsieh C. L. Evidence that protein binding specifies sites of DNA demethylation // *Molecular and cellular biology*. 1999. Vol. 19, no 1. P. 46-56.

10. Katevatis C., Fan A., Klapperich C.M. Low concentration DNA extraction and recovery using a silica solid phase // *PLoS One*. 2017. Vol. 12, no 5. P. 1-14.

11. Патент № 2129614 С1 Российская Федерация, МПК С12Р 21/06, А23J 1/18, С07Н 21/00. Способ получения нуклеиновых кислот и аминокислот из автолизатов пекарских дрожжей : № 93032352/13 : заявл. 21.06.1993 : опубл. 27.04.1999 / В. Ф. Селеменев, Г. Ю. Орос, И. В. Руденко [и др.]. – EDN BOJYOI.

12. Rimola A., Costa D., Sodupe M., Lambert J.F., Ugliengo P. Silica surface features and their role in the adsorption of biomolecules: computational modeling and experiments. // *Chemical Reviews*. 2013. Vol. 113, no 6. P. 4216-4313.

13. Poeskh T., Lopez S., Fuller A.O., Solomon M.J., Larson R. G. Adsorption and elution characteristics of nucleic acids on silica surfaces and their use in designing a miniaturized purification unit // *Analytical Biochemistry*. 2008. Vol. 373, no 2. P. 253-262.

14. Kramer M.F., Coen D. M. Enzymatic Amplification of DNA by PCR: Standard Procedures and Optimization // *Current Protocols in Molecular Biology*. 2011. CHAPTER: Unit15.10.

References

1. Ashapkin V.V., Kutueva L.I., Aleksandrushkina N.I., Vanyushin B.F. Epigenetic mechanisms of plant adaptation to biotic and abiotic stresses. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020; 21(20): 7457.

2. Vanyushin B.F., Ashapkin V.V. DNA methylation in higher plants: past, present and future. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*. 2011; 1809(8): 360-368.

3. Kirnos M.D., Aleksandrushkina N.I., Vanyushin B.F. 5-метилцитозин в пиримидиновых последовательностях ДНК растений и животных: специфичность метилирования. *Biochemistry*. 1981; 46(12): 1458-1474.

4. Smirnikhina S.A., Lavrov A.V. Методы оценки метилирования остатков цитозина в ДНК. *Молекулярная биология*. 2009; 43(3): 387-391.

5. Ryabushkina N.A., Omasheva M.E., Galiakparov N.N. Spetsifika vydeleniya DNK iz rastitel'nykh ob'ektov. *Biotechnologiya. Teoriya i praktika*. 2012; 2: 9-26. (In Russ.)

6. Eprintsev A.T., Popov V.N., Fedorin D.N. Identifikatsiya i issledovanie ekspressii genov. Voronezh: Izd-vo Voronezh. un-ta, 2008. 63 p. (In Russ.)

7. Selemenev V.F., Rudakova L.V., Rudakov O.B., Belanova N.A., Nazarova A.A. Fosfolipidy na fone prirodnih matricz. Voronezh: Science Book. 2020. 318 p. (In Russ.)

8. Selemenev V.F., Rudakov O.B., Slavinskaya G.V., Drozdova N.V. Pigmenty pishhevykh proizvodstv (Melanoidiny). М: Delhi Print. 2008. 246 p. (In Russ.)

9. Hsieh C.L. Evidence that protein binding specifies sites of DNA demethylation. *Molecular and cellular biology*. 1999; 19(1): 46-56.



10. Katevatis C., Fan A., Klapperich C.M. Low concentration DNA extraction and recovery using a silica solid phase. *PLoS One*. 2017; 12(5): 1-14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176848>

11. Selemenev V.F., Oros G.Yu., Rudenko I.V., Stukalov O.I., Tsyurupa M.P., Davankov V.A. Sposob polucheniya nukleinykh kislot i aminokislot iz avtolizatov pekarskikh drozhzhei. 1999.

12. Rimola A., Costa D., Sodupe M., Lambert J.F., Ugliengo P. Silica surface features and their role in the adsorption of biomolecules: computational modeling and experiments. *Chemical Reviews*. 2013; 113(6):

4216-4313.

<https://doi.org/10.1021/cr3003054>

13. Poeckh T., Lopez S., Fuller A.O., Solomon M.J., Larson R.G. Adsorption and elution characteristics of nucleic acids on silica surfaces and their use in designing a miniaturized purification unit. *Analytical Biochemistry*. 2008; 373(2): 253-262. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.10.026>

14. Kramer M.F., Coen D.M. Enzymatic Amplification of DNA by PCR: Standard Procedures and Optimization. *Current Protocols in Molecular Biology*. 2011; CHAPTER: Unit15.10.

Информация об авторах / Information about the authors

Г.Б. Анохина – ассистент кафедры биохимии и физиологии клетки, м.н.с., Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

А.Ю. Селиванов – студент кафедры биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

А.С. Грязев – студент кафедры биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

А.Т. Епринцев – профессор кафедры биохимии и физиологии клетки, заведующий кафедрой биохимии и физиологии клетки, д.б.н., Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

О.Е. Чухлебова – студент, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

G.B. Anokhina – assistant of Department of Biochemistry and Cell Physiology, Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, e-mail: Dowi2009@mail.ru

A.Yu. Selivanov – student of Department of Biochemistry and Cell Physiology, Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, e-mail: bc366@bio.vsu.ru

A.S. Gryazev – student of Department of Biochemistry and Cell Physiology, Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, e-mail: bc366@bio.vsu.ru

A.T. Eprintsev – Doctor of Biological Sciences, Professor, Head of the Department of Biochemistry and Cell Physiology, Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, e-mail: bc366@bio.vsu.ru

O.E. Chukhlebova – student of Department of Biochemistry and Cell Physiology, Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation

Статья поступила в редакцию 30.12.2022; одобрена после рецензирования 14.02.2023; принята к публикации 15.02.2023.

The article was submitted 30.12.2022; approved after reviewing 14.02.2023; accepted for publication 15.02.2023.