



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 577.218

doi: 10.17308/sorpchrom.2025.25/13446

Метод конверсии ДНК бисульфитом натрия с сорбцией на оксид кремния

Галина Борисовна Анохина, Екатерина Валерьевна Плотникова,
Александр Трофимович Епринцев[✉]

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

Аннотация. В настоящее время исследования метилирования ДНК представляют значительный интерес в фундаментальных и прикладных направлениях, позволяющих раскрыть неизвестные аспекты контроля за пролиферацией и дифференцировкой клеток (в том числе и аномальной), механизмы адаптации, а также разработать способы регуляции работы генома без изменения нуклеотидной последовательности, в том числе и для создания методов лечения различных опухолей, и других аномалий, связанных с нарушением паттерна экспрессии некоторых генов. Цель работы – разработка и оптимизация метода конверсии ДНК бисульфитом натрия для дальнейшего исследования метилирования ДНК в клетках эукариот. Представленный в данной работе метод основан на модификации ДНК за счет дезаминирования неметилированного цитозина с помощью бисульфита натрия. Методика включает четыре ключевых этапа: денатурация ДНК с использованием щелочи, модификация ДНК путем инкубации с раствором бисульфита натрия при повышенных температурах, очистка ДНК, десульфонирование. Очистка ДНК – критический этап, осуществлялся путем сорбции модифицированной ДНК на диоксид кремния. Проведение стадии твёрдофазной экстракции позволило получить модифицированную ДНК без примесей солей бисульфита, что подтверждалось результатами электрофореза в 1% агарозном геле в присутствии бромистого этидия. Описанный протокол позволяет проводить эффективную модификацию ДНК, полученную из различных тканей, со степенью конверсии ДНК 96-98% с незначительными потерями целевого продукта (33-41%) во время модификации. Данный метод оптимизирует процесс бисульфитной конверсии, предоставляя надежный и экономичный инструмент для анализа паттернов метилирования, с потенциалом к улучшению нашего понимания регуляции экспрессии генов, биологии канцерогенеза и облегчения получения организмов с заданными свойствами.

Ключевые слова: метилирование, ДНК, эпигенетика, модификация, бисульфит натрия, сорбция, электрофорез.

Для цитирования: Анохина Г.Б., Плотникова Е.В., Епринцев А.Т. Метод конверсии ДНК бисульфитом натрия с сорбцией на оксид кремния // Сорбционные и хроматографические процессы. 2025. Т. 25, № 5. С. 782-790. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2025.25/13446>

Original article

Method for DNA conversion using sodium bisulfite with adsorption onto silica matrix

Galina B. Anokhina, Ekaterina V. Plotnikova, Alexander T. Eprintsev[✉]

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

Abstract. Currently, studies related to DNA methylation are in focus of fundamental and applied research. They allow revealing unknown aspects of controlling cell proliferation and differentiation (including abnormal), understanding adaptation mechanisms, and developing methods for regulating the genome functioning without changing its nucleotide sequence. They also contribute to the development of methods for treating various tumours and other abnormalities associated with the disrupted expression of certain genes. The purpose



of the work is to develop and optimise the method of DNA conversion with sodium bisulphite for further study of DNA methylation in eukaryotic cells. The method presented in this paper is based on DNA modification by deamination of unmethylated cytosine with sodium bisulphite. The procedure consists of four key stages: DNA denaturation with alkali, DNA modification by incubation with sodium bisulphite solution at high temperatures, DNA purification, and desulfonation. DNA purification is a critical stage, which was carried out by sorption of modified DNA on silicon dioxide. The solid-phase extraction made it possible to obtain modified DNA without bisulphite salt impurities, which was confirmed by the results of electrophoresis in 1% agarose gel in the presence of ethidium bromide. The described protocol allows for effective modification of DNA obtained from various tissues with a degree of DNA conversion of 96-98% with insignificant losses of the target product (33-41%) during the modification. This method optimises the process of bisulphite conversion by providing a reliable and cost-effective tool for analysing methylation patterns. It also contributes to a better understanding of the regulation of gene expression and the biology of carcinogenesis. It can also facilitate the production of organisms with desired properties.

Keywords: methylation, DNA, epigenetics, modification, sodium bisulphite, sorption, electrophoresis

For citation: Anokhina G.B., Plotnikova E.V., Eprintsev A.T. Method for DNA conversion using sodium bisulfite with adsorption onto silica matrix. *Sorbtionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2025. 25(5): 782-790. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpcrom.2025.25/13446>

Введение

Экспрессия генов – процесс реализации генетической информации организма, регуляция которого осуществляется на нескольких уровнях организации: биохимическом, генетическом и эпигенетическом. Существенные различия в уровне матричной РНК и белков между клетками одного организма, а также их вариации на разных стадиях жизненного цикла нередко наследуются в ряду поколений и обусловлены эпигенетическими механизмами контроля [1]. Колебания в экспрессионной активности генов часто обеспечивают не только фенотипические и функциональные различия в клеточных линиях, но и адаптивные способности организмов к изменяющимся условиям среды, однако, случайные изменения в профиле экспрессии тех или иных генов могут играть не только положительный (например, в качестве способа расширения границ изменчивости и адаптивности), но и отрицательный эффект, способствуя появлению мутаций, сопряженных с инактивацией ферментных систем, играющих важную роль в метаболизме как отдельных клеток, так и всего организма, а также регулирующих клеточный цикл. Работы последних десятилетий позволяют с уверенностью предположить, что эпигенетические механизмы регуляции работы генома играют ключевую роль в

обеспечении контроля экспрессионной гетерогенности [1].

Эпигенетические механизмы контроля работы генома представляют собой наследуемые процессы, обеспечивающие регуляцию активности экспрессии генов, несвязанные с изменением нуклеотидной последовательностью ДНК. Ковалентные модификации ДНК и коровых гистонов являются важными эпигенетическими факторами, обеспечивающими регуляцию экспрессии генов [2-5].

Метилирование ДНК. Метилирование ДНК в своем «классическом» варианте представляет собой ковалентное присоединение метильной группы в 5'-положение цитозинового основания. Данный эпигенетический механизм играет ключевую роль во многих биологических процессах, обеспечивая регуляцию экспрессии генов, тем самым участвуя и обеспечивая эмбриональное развитие, клеточную пролиферацию, дифференциацию и стабильность хромосом [6]. Эпигенетические модификации изменяют паттерны транскрипции в многоклеточных организмах для достижения тканеспецифичной экспрессии генов [7]. Нарушения в паттернах метилирования у человека и млекопитающих сопряжены с расстройством импринтинга и канцерогенезом [6].

Метилирование цитозина в цепи ДНК осуществляется посредством функциони-



рования специфических ферментных систем - ДНК-метилтрансфераз (ДМТ), которые специфически присоединяют CH₃-группу к CpG-динуклеотидам, входящим в состав гена, образуя 5'-метилцитозин. CpG-динуклеотиды представляют собой располагающиеся рядом цитозин и гуанин, разделенные фосфатом (5'-C-phosphate-G-3'). Метилирование ДНК у млекопитающих осуществляется преимущественно по CpG-сайтам, в то время как у растений встречается в трех контекстах: CpG, CpNpG и CpNpN (N = A, T, C), которые устанавливаются и поддерживаются уникальным набором ДНК-метилтрансфераз и регулируются специфичными для растений путями [8-10]. Увеличение степени метилирования ДНК в регуляторных областях (например, в области промотора) и телях генов приводит к снижению или полному подавлению экспрессии этих генов, в то время как снижение доли метилированных цитозинов наоборот способствует индукции транскрипционной их активности. Присоединение метильной группы в 5'-положение цитозинового кольца в составе молекулы ДНК приводит к смене профиля экспрессии гена в виду, в том числе, изменения пространственной структуры хроматина (увеличение компактизации хроматина препятствует транскрипции гена) [1, 4, 8, 11-13, 15-19]. Кроме того, важно отметить, что метилирование ДНК также играет важную роль в системе защиты генома от инвазивных/чужеродных последовательностей ДНК (например, транспозоны), метилируя и, тем самым, инактивируя их [14].

Метилирование ДНК – распространенный механизм регуляции экспрессии генов у растений [20-22]. За последние десятилетия человечество существенно продвинулось в понимании процессов метилирования, однако, существует огромное количество белых пятен в данной области биологии.

Важная роль метилирования ДНК, как одного из механизмов эпигенетической

регуляции работы генома, создает потребность в эффективных и чувствительных методах анализа метильного статуса отдельных участков ДНК. Бисульфитное геномное секвенирование, разработанное Фроммером и коллегами, было признано революцией в анализе метилирования ДНК [23, 24]. В основе метода лежит конверсия ДНК с использованием бисульфита натрия. Однако, несмотря на достоинства метода бисульфитного секвенирования, на практике этап бисульфитной конверсии является критическим. Успешность его проведения напрямую влияет на дальнейшее исследование. Более того, чаще всего, ошибки или неудачи проведения бисульфитной модификации ДНК приводят к недостоверным результатам или полному их отсутствию. В связи с этим целью работы являлась разработка эффективного, надежного и недорогого метода бисульфитной конверсии ДНК на основании имеющихся в мировой практике методик. В данной статье мы представляем протокол, который в настоящее время часто используется в нашей лаборатории и который дает точные и воспроизводимые результаты.

Экспериментальная часть

Метилирование цитозина является распространенной пост-репликативной модификацией ДНК у млекопитающих и растений. Методы определения участков метилирования ДНК представляют интерес не только в качестве источника фундаментальных знаний основ эпигенетической регуляции, но и с практической точки зрения. Как известно, канцерогенез нередко сопряжен с изменением метильного профиля генов супрессоров опухолей и генов, ответственных за регуляцию клеточного цикла [25].

Принципиальная основа метода. В настоящее время в качестве одного из способов исследования метильного статуса генома эукариотической клетки применяют бисульфитное секвенирование ДНК. При этом, важным этапом данного

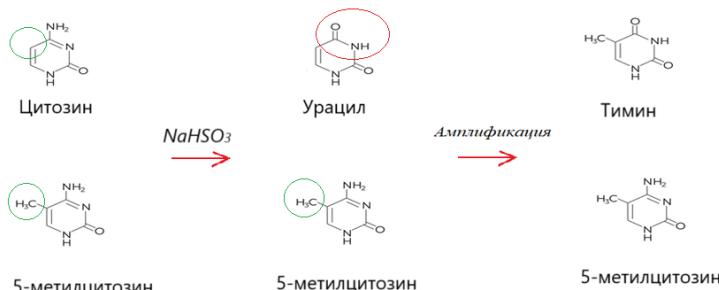


Рис. 1. Схема химической модификации цитозина (метилированного и неметилированного) бисульфитом натрия

Fig. 1. Scheme of chemical modification of cytosine (methylated and non-methylated) with sodium bisulfite

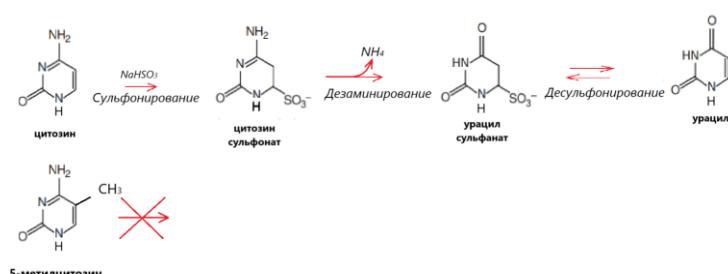


Рис. 2. Схема модификации ДНК бисульфитом натрия с указанием основных этапов

Fig. 2. Scheme of DNA modification with sodium bisulfite, indicating the main steps

исследования является предварительная химическая трансформация ДНК (конверсия) с помощью бисульфита натрия [26]. В основе метода бисульфитной конверсии лежит способность бисульфита натрия приводить к дезаминированию цитозина в составе молекулы ДНК, с дальнейшим химическим десульфонированием его в урацил в присутствии щелочи. При этом, важно отметить, что бисульфит натрия преобразует метилированный цитозин (m5C) гораздо медленнее (рис. 1) [27].

Химическая модификация исследуемой ДНК, способствующая превращению цитозина в урацил с дальнейшей амплификацией в присутствии праймеров для бисульфитного секвенирования, приводит к синтезу молекулы ампликона. В процессе проведения ПЦР урацил распознается ДНК-полимеразой как тимин. Секвенирование клонированного ампликона – бисульфитное геномное секвенирование, позволяет точно обнаружить присутствие m5C в исследуемой области ДНК с разрешением в один нуклеотид

[23, 24]. Существенное преимущество данного метода перед другими заключается в том, что он обеспечивает чтение статуса метилирования каждого отдельного цитозина, что позволяет идентифицировать дифференциально метилированные молекулы ДНК в популяции клеток, а также исследовать динамику изменения метильного статуса интересующих участков генома [28].

Обсуждение результатов

Трансформацию ДНК бисульфитом натрия условно можно разделить на несколько этапов (рис. 2):

1. Денатурация ДНК. Геномная ДНК (до 10 мкг/мл) денатурируется в присутствии щелочи. Высокая концентрация ДНК при бисульфитной конверсии (более 10 мкг/см³) может существенно снизить долю конвертированных молекул, что может быть связано с недостаточным содержанием бисульфита натрия в пересчете на количество молекул ДНК, с увеличением pH среды за счёт образования побочного продукта реакции - NH_4^+ , и как



следствие, снижению способности бисульфита модифицировать ДНК.

2. Модификация ДНК путем инкубации денатурированной ДНК в растворе бисульфита натрия при температуре выше 50°C. Модуляции температуры культивирования, а также проведение нескольких циклов инкубации могут способствовать оптимизации процесса конверсии ДНК, а также снижению/увеличению времени проведения данного этапа. Неполная конверсия ДНК может привести к появлению ложноположительных или ложноотрицательных результатов. Ренатурация (полная или частичная) ДНК может приводить к существенному снижению конверсии, поэтому целесообразно использовать циклический протокол инкубации ДНК в растворе бисульфита. Кроме того, введение дополнительной стадии обработки образца ДНК протеиназой K позволит избавиться от белков, присутствующих в образце.

3. Очистка ДНК от солей бисульфита. Данная стадия очень важна, так как бисульфит натрия в реакционной среде не только способствует деградации ДНК за счёт сильных окислительных свойств самого бисульфита, но также за счёт способности бисульфита натрия ингибировать работу ДНК-полимераз, ингибирует репликацию ДНК. Наиболее быстрым и эффективным методом очистки ДНК от бисульфита натрия является сорбция молекулы нуклеиновой кислоты на твердом носителе. Использование магнитных частиц в качестве сорбента в составе коммерческих наборов часто осложняется тем, что соли бисульфита сорбируются на магнитные частицы наряду с модифицированной ДНК, тем самым препятствуя дальнейшим исследованиям. Кроме того, нередко, на магнитные частицы сорбируются в большей степени короткие фрагменты модифицированной ДНК, что в дальнейшем, может привести к появлению ложно положительных и ложноотрицательных результатов.

4. Десульфонирование сульфонилурациловых аддуктов осуществляется также в присутствии щелочи.

Несмотря на то, что в настоящее время существует множество различных наборов для бисульфитной конверсии ДНК они не всегда эффективны, дают достаточно низкий выход модифицированной ДНК и очень дорогостоящи. Исследование большого количества образцов в этом случае может быть очень накладным. Проведение бисульфитной конверсии ДНК «вручную» позволяет не только эффективно и недорого осуществить этот этап исследования, но и адаптировать его к конкретным объектам, целям и условиям работы. Ниже мы предлагаем используемый нами протокол бисульфитной конверсии ДНК, который показал высокую эффективность и низкую себестоимость, в сравнении с использованием коммерческих наборов.

Оценка качества полученного препарата. Для оценки пригодности полученной модифицированной ДНК для дальнейших исследований удобно использовать метод электрофореза нуклеиновых кислот в агарозном геле. Для визуализации нуклеиновой кислоты при подготовлении в гель добавляется бромистый этидий. Важно отметить, что модифицированная ДНК на электрофорограмме будет иметь меньший размер в сравнении с немодифицированной ДНК. Присутствие в полученном препарате солей бисульфита и спиртов приведет к невозможности визуализации ДНК. Более того, присутствие бисульфита вызывает появление на электрофорограмме в УФ-свете зелено-голубого пятна.

Материалы. 3М водный раствор NaOH (ГОСТ 4328-77, хч, Россия) (свежеприготовленный). 200 mM гидрохинон (свежеприготовленный). Для этого растворяли 0.022 г гидрохинона (Sigma Aldrich, США) в 1 см³ дистиллированной воды, очищенной от нуклеаз. 6.9 M раствор бисульфита натрия (рН 5.0-5.3). Раствор би-



сульфита натрия готовили непосредственно перед работой. Бисульфит натрия (Sigma Aldrich, США) растворяли в небольшом объеме дистиллированной воды, очищенной от нуклеаз, после чего проверяли pH раствора. При необходимости значения pH доводили до 5.0-5.3 с помощью 3 М NaOH. На 40 проб достаточно было 1 см³ раствора гидрохинона и 12 мл раствора бисульфита натрия. Растворы не хранятся, их необходимо готовить непосредственно перед проведением модификации ДНК. Протеиназа K (Евроген, Россия). Обработка протеиназой K осуществлялась в соответствии с рекомендациями производителя. Дистиллированная вода, очищенная от нуклеаз (dH₂O) 80 и 96% этанол. 10 М ацетат аммония или 3М ацетат натрия (HiMedia Laboratories, Индия). Использование и той, и другой соли равновероятно и не приводило к снижению эффективности, однако, следует учесть, что соли аммония и соли натрия необходимы в качестве осадителя ДНК. Предпочтительно использовать ацетат аммония, так как соли аммония не ингибируют ПЦР, в то время как ацетат натрия ингибирует активность ДНК-полимеразы, препятствуя амплификации в том случае, если отмыка от солей была осуществлена небрежно, то есть не в полной мере. Гликоген (3 мг/см³) (Thermo scientific, Thermo FC, США), выступал в качестве со-осадителя ДНК. Сорбент на основе диоксида кремния. Магнитные сорбенты, к сожалению, не пригодны для отмыки ДНК от солей бисульфита. В качестве сорбента можно применять коммерческие наборы, однако мы предлагаем использовать самостоятельно приготовленный сорбент как описано нами [29].

Этап 1. Денатурация. К 2 мкг ДНК или 1 нг очищенного фрагмента добавляли 5.5 мкл свежеприготовленного 3М NaOH, после чего доводили dH₂O до 50 мкл. Использование слишком большого количества ДНК может привести к неполному дезаминированию. Инкубировали 30 ми-

нут при 37 °C. Пока шла инкубация готовили растворы бисульфита натрия и гидрохинона, после чего готовили модифицирующий раствор. Смесь необходимо использовать сразу после наведения, так как она не подлежит хранению. Далее приведен пример приготовления модифицирующего раствора на 10 проб.

Модифицирующий раствор. К 250 мкл 200 мМ раствора гидрохинона добавляли 3 мл раствора бисульфита натрия. Проверяли, чтобы pH раствора составлял 5.0-5.3. Доводили модифицирующую смесь до 10 мл. К 50 мкл денатурированной ДНК добавляли 30 единиц Протеиназы K (Евроген, Россия) и следовали протоколу производителя - инкубировали сначала 10 минут при 55°C, после 5 минут при 65°C.

Этап 2. Модификация ДНК. Добавляли к пробам, обработанным протеиназой K, 450 мкл модифицирующего раствора. Инкубировали образцы в амплификаторе Biometra Personal cycler (Biometra, Германия) согласно следующему протоколу:

15 циклов { 94° C – 3 минуты;
55° C – 15 минут;

Инкубировали образцы при 4 °C в течение 5 минут. После проведения этой стадии можно прерваться и заморозить образцы на срок до 48 часов.

Этап 3. Очистка модифицированной ДНК от бисульфита натрия путем сорбции на мелкодисперсном диоксиде кремния (SiO₂). К модифицированной ДНК, полученной на предыдущем этапе, добавляли 100 мкл мелкодисперсного диоксида кремния, приготовленного по методике, как описано в [29] и тщательно и осторожно перемешивали образцы в течение 3-5 минут. На этой стадии происходило непосредственная сорбция ДНК на кремниевый носитель. Чем больше размер частиц, тем больше молекул ДНК связывалось с сорбентом. Важно было избежать тряски пробирок, которая могла привести к повреждениям молекулы ДНК. Добавляли 2.5 объема 80% этанола (\approx 1.3 см³) и тщательно перемешивали.



Центрифугировали 5000 g в течение 5-7 минут при комнатной температуре. Надосадок удаляли, а осадок промывали 800 мкл 80% этанола. Высушивали с открытой крышкой в течение 5 минут до исчезновения запаха этанола. Модифицированную ДНК десорбировали путем добавления 300 мкл воды, свободной от ДНКаз и переносили надосадок в новую пробирку.

Этап 4. Десульфонирование. К раствору добавляли 33 мкл 3M NaOH. Тщательно перемешивали. Смесь инкубировали 20 минут при 37°C в твердотельном термостате (ДНК-технология, Россия). Добавляли 6 мкл гликогена и 105 мкл 10M ацетата аммония (рН 5.6) (или 33 мкл 3M ацетата натрия (рН 5.4)). После чего к раствору приливали 1350 мкл 80% этанола (примерно 3 объема). Перемешивали, переворачивая пробирку в течение 1 минуты, и инкубировали при -20°C не менее 20 минут. Обычно для осаждения ДНК 20-30 минут при -20 °C вполне достаточно, но можно продлить эту стадию на срок до 2 и более часов. Центрифугировали на центрифуге Eppendorf Centrifuge 5804 R (Eppendorf, Германия) 30 минут при 13000 g при комнатной температуре. Надосадок удаляли, а осадок дважды промывали 80% этанолом. Высушивали 5-7 минут с открытой крышкой. Растворяли осажденную и промытую ДНК в 20-50 мкл воды или TE-буфера.

В случае, если в пробирке на стадии 18 наблюдали большое количество белого осадка, доделывали до стадии 21 и переходили к 3 этапу, еще раз проводили сорбцию модифицированной ДНК на оксид кремния. Присутствие в образцах солей бисульфита и его производных способно препятствовать визуализации модифицированной ДНК с помощью электрофореза в 1% агарозном геле и ингибировать ПЦР [30, 31].

Трансформация ДНК бисульфитом натрия изменяет физико-химические свойства двухцепочечной молекулы ДНК.

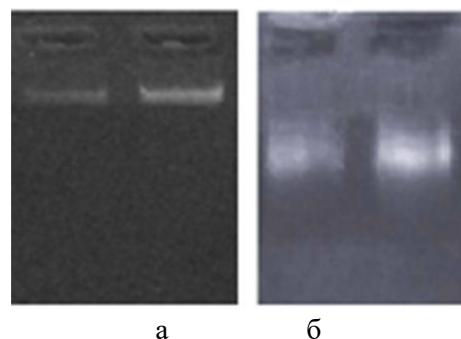
ДНК из большой стабильной двухцепочечной молекулы конвертируется в набор одноцепочечных фрагментов, в которых все неметилированные цитозины полностью заменены на урацил.

Концентрацию модифицированной ДНК определяли спектрофотометрически спектрофотометрически на приборе Evolution 260 Bio (Thermo Fisher Scientific, США) в 0.09%, при длине волны 260 нм: 1.0= 40 мкг/мл.

Электрофорез модифицированной в 1% агарозном геле. Качественный анализ модифицированной ДНК осуществляли путём проведения электрофореза в 1% агарозном геле (Helicon, Россия) с добавлением бромистого этидия (Sigma Aldrich, США) в камере для горизонтального электрофореза (Helicon, Россия) с использованием в качестве источника тока прибора Эльф- 4 (ДНК-технология, Россия). В качестве буферной системы использовали 1X TAE-буфер (рН 8.0). В одну лунку геля вносили порядка 100 нг модифицированной ДНК, смешанной с загрузочным буфером Gel Loading Dye, Blue (Евроген, Россия).

Для визуализации полос ДНК на электрофорограмме использовали трансиллюминатор Serva Blue cube 300 (SERVA Electrophoresis GmbH, Германия) с длиной волны 312 нм. На рисунке 3Б показана типичная электрофорограмма модифицированной по представленной методике ДНК в 1% агарозном геле.

Часто, после электрофореза в геле не визуализируется модифицированная ДНК, что связано с тем, что молекула почти полностью становится одноцепочечной и существенно деградирует. Охлаждение геля в течение 5-10 минут на ледянной бане способствовало спариванию оснований для возможного взаимодействия с бромистым этидием. Модифицированная ДНК на геле в этом случае выглядит как шмеры порядка 400-1800 п.н.



а б

Рис. 3. Электрофорез ДНК в 1% агарозном геле в присутствии бромистого этидия: а – электрофорез ДНК до модификации бисульфитом натрия; б – электрофорез ДНК, подвергнутой модификации бисульфитом натрия.

Fig. 3. Electrophoresis of DNA in 1% agarose gel in the presence of ethidium bromide: (a) electrophoresis of DNA before modification with sodium bisulfite; (b) electrophoresis of DNA modified with sodium bisulfite.

(рис.3Б). Появление на электрофоре- грамме зеленых пятен указывает на при- сутствие в образцах ДНК солей бисуль- фита и его производных, приводящих к невозможности связывания бромистого этидия с модифицированной ДНК, а также проведения ПЦР.

Заключение

Таким образом, представленная в ра- боте методика позволяет провести моди- фикацию ДНК, полученную из эукарио- тических клеток. Преимуществом дан- ного метода является его относительная простота, которая не требует специаль- ного дорогостоящего оборудования и ре- активов. Конверсия ДНК, по методике, пред- ставленной в статье, позволяет полу- чить ДНК со степенью конверсии по- рядка 96-98%. Потери ДНК в ходе моди- фикации составляют порядка 33-41%, что в целом для данного метода является хо-

рошим результатом. Важным этапом дан- ного метода является сорбция модифици- рованной ДНК на мелкодисперсный ок- сид кремния, что позволяет избежать за- грязнения целевого продукта солями би- сульфита, которые могут препятствовать дальнейшим исследованиям. Проведение рутинного электрофореза ДНК в 1% ага- розном геле позволяет качественно оце- нить чистоту полученного препарата от модифицирующего агента. Более того, невысокая себестоимость используемых реагентов позволяет конвертировать ДНК в значительных объемах, анализи- руя в дальнейшем большое количество образцов.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет из- вестных финансовых конфликтов интересов или личных отношений, которые могли бы повлиять на работу, представ- ленную в этой статье.

- Список литературы/References
1. Semenova E.V., Varfolomeeva E.Ju., Filatov M.V. *Citologija*, 2020; 62(2):79-97.
 2. Semenova E.V., Filatov M.V. *Citologija*, 2013; 55(5): 290.
 3. Battich N., Stoeger T., Pelkmans L. *Cell*, 2015; 163: 1596.
 4. Stoeger T., Battich N., Pelkmans L. *Cell*, 2016; 164: 1151.
 5. Panzeri I., Pospisilik J.A. *Molecular metabolism*, 2018; 14: 26.

6. Krueger F., Kreck B., Franke A. *Nature methods*, 2012; 9: 145-151. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1828>
7. Amedeo P., Habu Y., Afsar K., Scheid O.M., Paszkowski J. *Nature*, 2000; 405: 203-206.
8. Leichter S.M., Du J., Zhong X. *Springer International Publishing*, 2022; 1389: 137-157. https://doi.org/10.1007/978-3-031-11454-0_6
9. Bird A.P., *Nucleic Acids Res*, 1980; 8: 1499-1504.
10. Coulondre C., Miller J.H., Farabaugh, P.J., Gilbert, W., *Nature*, 1978; 274: 775-780.



11. Ashapkin V.V., Kutueva L.I., *International Journal of Molecular Sciences*, 2020; 21: 7457.
12. Bird A.P., Wolffe A.P. *Cell*, 1999; 99: 451-454.
13. Colot V., Rossignol J. L., *Bioessays*, 1999; 21: 402-411.
14. Hafiz I.A., Anjum M.A., Grewal A.G., Chaudhary G.A. *Acta physiologiae plantarum*, 2001; 23: 491-499.
15. Du J., Johnson L. M., Groth M., Feng S., Hale C. J., Li S., Jacobsen S. E. *Molecular cell*, 2014; 55: 495-504.
16. Du J., Johnson L.M., Jacobsen S.E., Patel D.J. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2015; 16: 519-532. <https://doi.org/10.1038/nrm4043>
17. Papareddy R. K., Paldi K., Smolka A. D., Hüther P., Becker C., Nodine M. D. *elife*, 2021; 10: 69396.
18. Lindroth A.M., Cao X., Jackson J.P., Zilberman D., McCallum C.M., Henikoff S. *Science*, 2001; 292: 2077-2080. <https://doi.org/10.1126/science.1059745>
19. Zhong X., Hale C.J., Nguyen M., Ausin I., Groth M., Hetzel J. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2015; 112: 911-916. <https://doi.org/10.1073/pnas.1423603112>
20. Eprincev A.T., Fedorin D.N., Anokhina G.B., Gataullina M.O., *Fiziologija rastenij*, 2021; 68(2): 187-193. (In Russ.)
21. Eprintsev A.T., Anokhina G.B., Shakhov Z.N., Moskvina P.P., Igamberdiev, A.U. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024; 25: 12711.
22. Eprintsev A.T., Anokhina, G.B., Selivanova, P.S., Moskvina, P.P., Igamberdiev, A.U. *Plants*, 2024; 13: 2651.
23. Frommer M., McDonald L.E., Millar D. S., Collis C.M., Watt F., Grigg G.W., Paul C.L. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1992; 89: 1827-1831.
24. Susan J. C., Harrison J., Paul C. L., Frommer, M. *Nucleic acids research*, 1994; 22: 2990-2997.
25. Qiu G. H., Salto-Tellez M., Ross J.A., Yeo W., Cui Y., Wheelhouse N., Hooi, S. C. *Journal of hepatology*, 2008; 48: 433-441.
26. Smirnihina S.A., Lavrov A.V., *Molekuljarnaja biologija*, 2009; 43(3): 387-391. (In Russ.)
27. Jackson J.P., Lindroth A.M., Cao X., Jacobsen S.E. *Nature*, 2002; 416: 556-560. <https://doi.org/10.1038/nature731>
28. Darst R. P., Pardo C. E., Ai L., Brown K. D., Kladde M. P. *Current protocols in molecular biology*, 2010; 91: 7-9.
29. Anokhina, G.B., Selivanov, A.Y., Gryazev, A.S., Eprintsev, A.T., Chukhlebova, O.E. *Sorbtionnye I Khromatograficheskie Protsessy*, 2023; 23(2), 290-298. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2023.23/11152>
30. Selemenev V.F., Rudakova L.V., Rudakov O.B., Belanova N.A., Nazarova A.A. *Fosfolipidy na fone prirodnyh matric*. Voronezh, Nauchnaja kniga, 2020, 318 p. (In Russ.)
31. Selemenev V. F., Rudakov O. B., Slavinskaja G.V., Drozdova N.V. *Pigmenty pishhevyyh proizvodstv (Melanoidiny)*. Moskva, DeLi print, 2008, 246 p. (In Russ.)

Информация об авторах / Information about the authors

Г.Б. Анохина – старший преподаватель кафедры биохимии и физиологии клетки, к.б.н., Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия, e-mail: dowi2009@mail.ru

Е.В. Плотникова – магистр кафедры биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия, e-mail: kate_plotnikova36@mail.ru

А.Т. Епринцев – профессор кафедры биохимии и физиологии клетки, заведующий кафедрой биохимии и физиологии клетки, д.б.н., Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия, e-mail: bc366@bio.vsu.ru

Information about the authors

G.B. Anokhina – senior lecturer, Ph.D (biology) department of biochemistry and cell physiology, Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, e-mail: dowi2009@mail.ru

E.V. Plotnikova – master's degree student department of biochemistry and cell physiology, Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, e-mail: kate_plotnikova36@mail.ru

A.T. Eprintsev – prof., grand Ph.D (biology), head of the department of biochemistry and cell physiology, Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, e-mail: bc366@bio.vsu.ru

Статья поступила в редакцию 05.06.2025; одобрена после рецензирования 17.11.2025; принята к публикации 26.11.2025.

The article was submitted 05.06.2025; approved after reviewing 17.11.2025; accepted for publication 26.11.2025.