

УДК 577.21:612.11

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЭКСТРАКЦИИ ДНК ИЗ ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ ФЕНОЛЬНО-ХЛОРОФОРМНЫМ И КОЛОНОЧНЫМ МЕТОДАМИ

Иванов А.Ю., Азарова Ю.Э.

Курский государственный медицинский университет (КГМУ)

Россия, 305041, Курская область, г. Курск, ул. К. Маркса, д. 3

Актуальность. В настоящее время исследование ДНК является одним из самых точных и информативных методов в медицине, криминалистике и молекулярной генетике. Успех анализа во многом зависит от качества выделенной ДНК, поэтому выбор оптимального метода её экстракции имеет ключевое значение для получения достоверных результатов.

Цель – провести сравнительный анализ эффективности экстракции ДНК хлороформно-фенольным и колоночным методами.

Материалы и методы. Материалом исследования послужили 94 образца крови из биобанка НИИ генетической и молекулярной эпидемиологии КГМУ. Выделение геномной ДНК из крови осуществляли хлороформно-фенольным и колоночным методами, используя для последнего набор реагентов ЭкстрактДНК-2 (НОМОТЕК, Россия). Анализ концентрации и чистоты полученных образцов ДНК проводили с помощью спектрофотометра NANO-DROP2000 (THERMOFISHERSCIENTIFIC, США). Статистический анализ данных выполнен в программе STATISTICA v.13.0 (STATSOFTINC., США).

Результаты. Анализ распределения концентрации и чистоты двух групп образцов, выполненный с помощью теста Колмогорова-Смирнова, выявил, что показатели концентрации ДНК в первой (полученной методом фенольно-хлороформной экстракции) и второй группе образцов (полученной колоночным методом), а также значения чистоты растворов второй группы ДНК имели ненормальное распределение ($P < 0,01$), тогда как распределение значений чистоты раствора ДНК первой группы образцов не отличалось от нормального. Установлено, что медиана концентрации ДНК, полученной фенольно-хлороформной экстракцией составила 119,50 нг/мкл ($Q1=89,10$; $Q3=182,20$) и статистически значимо превышала медиану концентрации образцов второй группы: $Me=39,05$ нг/мкл ($Q1=26,80$; $Q3=54,10$, $P=3,69 \times 10^{-16}$). При этом медиана чистоты растворов А 260/280 ДНК первой группы образцов ($Me=1,69$ ($Q1=1,65$; $Q3=1,74$)) оказалась ниже такового показателя образцов второй группы: $Me=1,84$ ($Q1=1,80$; $Q3=1,87$, $P=1,99 \times 10^{-15}$).

Заключение. Сравнение двух методов выделения ДНК из крови позволило установить, что фенольно-хлороформная экстракция дает значимо больший выход ДНК, однако уступает колоночному методу по показателю чистоты растворов.

Ключевые слова: фенольно-хлороформная экстракция ДНК, колоночный метод выделения ДНК, чистота раствора нуклеиновых кислот.

Иванов Артём Юрьевич – студент 1 курса биотехнологического факультета, КГМУ, г. Курск. ORCID ID: 0009-0006-3447-0715. E-MAIL: ARTEMIVANOV1612@GMAIL.COM (автор, ответственный за переписку).

Азарова Юлия Эдуардовна – д.м.н., заведующий кафедрой биологической и химической технологии, заведующий лабораторией биохимической генетики и метаболомики НИИ генетической и молекулярной эпидемиологии КГМУ, г. Курск. E-MAIL: AZZZAR@YANDEX.RU.

УДК 577.21:612.11

A COMPARATIVE ANALYSIS OF THE EFFICIENCY OF DNA EXTRACTION FROM WHOLE BLOOD SAMPLES BY PHENOL-CHLOROFORM AND COLUMN METHODS

IVANOV A.YU., AZAROVA YU.E.

KURSK STATE MEDICAL UNIVERSITY (KSMU)

305041, 3, K. MARX STREET, KURSK, RUSSIAN FEDERATION

RELEVANCE. DNA ANALYSIS IS CURRENTLY ONE OF THE MOST ACCURATE AND INFORMATIVE METHODS IN MEDICINE, FORENSICS, AND MOLECULAR GENETICS. THE SUCCESS OF THE ANALYSIS LARGELY DEPENDS ON THE QUALITY OF THE ISOLATED DNA, SO CHOOSING THE OPTIMAL EXTRACTION METHOD IS CRUCIAL FOR OBTAINING RELIABLE RESULTS.

OBJECTIVE: IS TO CONDUCT A COMPARATIVE ANALYSIS OF THE EFFICIENCY OF DNA EXTRACTION BY CHLOROFORM-PHENOL AND COLUMN METHODS.

MATERIALS AND METHODS. THE STUDY INCLUDED 94 BLOOD SAMPLES FROM THE BIOBANK OF THE RESEARCH INSTITUTE OF GENETIC AND MOLECULAR EPIDEMIOLOGY, KSMU. GENOMIC DNA WAS ISOLATED FROM THE BLOOD USING THE CHLOROFORM-PHENOL AND COLUMN METHODS, USING THE EXTRACTDNA-2 REAGENT KIT (NOMOTEK, RUSSIA). THE CONCENTRATION AND PURITY OF THE OBTAINED DNA SAMPLES WERE ANALYZED USING A NANODROP2000 SPECTROPHOTOMETER (THERMOFISHERSCIENTIFIC, USA). STATISTICAL ANALYSIS WAS PERFORMED USING STATISTICA V.13.0 (STATSOFTINC., USA).

RESULTS. ANALYSIS OF THE DISTRIBUTION OF CONCENTRATION AND PURITY OF TWO GROUPS OF SAMPLES, PERFORMED USING THE KOLMOGOROV-SMIRNOV TEST, REVEALED THAT THE DNA CONCENTRATION VALUES IN THE FIRST (OBTAINED BY PHENOL-CHLOROFORM EXTRACTION) AND SECOND GROUP OF SAMPLES (OBTAINED BY THE COLUMN METHOD), AS WELL AS THE PURITY VALUES OF THE DNA SOLUTIONS OF THE SECOND GROUP, HAD AN ABNORMAL DISTRIBUTION ($P < 0.01$), WHEREAS THE DISTRIBUTION OF THE PURITY VALUES OF THE DNA SOLUTION OF THE FIRST GROUP OF SAMPLES DID NOT DIFFER FROM NORMAL. IT WAS FOUND THAT THE MEDIAN CONCENTRATION OF DNA OBTAINED BY PHENOL-CHLOROFORM EXTRACTION WAS $119.50 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ($Q1=89.10$; $Q3=182.20$) AND STATISTICALLY SIGNIFICANTLY EXCEEDED THE MEDIAN CONCENTRATION OF SAMPLES OF THE SECOND GROUP: $ME=39.05 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ($Q1=26.80$; $Q3=54.10$, $P=3.69 \times 10^{-16}$). MOREOVER, THE MEDIAN PURITY A 260/280 OF DNA SOLUTIONS FOR THE FIRST GROUP OF SAMPLES ($ME=1.69$ ($Q1=1.65$; $Q3=1.74$)) WAS LOWER THAN THAT OF THE SECOND GROUP OF SAMPLES: $ME=1.84$ ($Q1=1.80$; $Q3=1.87$, $P=1.99 \times 10^{-15}$).

CONCLUSION. A COMPARISON OF THE TWO METHODS FOR DNA EXTRACTION FROM BLOOD REVEALED THAT PHENOL-CHLOROFORM EXTRACTION GIVES A SIGNIFICANTLY HIGHER DNA YIELD, BUT IS INFERIOR TO THE COLUMN METHOD IN TERMS OF SOLUTION PURITY.

KEYWORDS: PHENOL-CHLOROFORM DNA EXTRACTION, COLUMN DNA EXTRACTION, NUCLEIC ACID SOLUTION PURITY.

IVANOV ARTEM YU. – 1 YEAR STUDENT OF THE BIOTECHNOLOGICAL FACULTY, KURSK STATE MEDICAL UNIVERSITY, KURSK, RUSSIAN FEDERATION. ORCID ID: 0009-0006-3447-0715. EMAIL: ARTEMIVANOV1612@GMAIL.COM (THE AUTHOR RESPONSIBLE FOR THE CORRESPONDENCE).

AZAROVA IULIIA E. – DOCTOR OF MEDICAL SCIENCES, HEAD OF THE DEPARTMENT OF BIOLOGICAL AND CHEMICAL TECHNOLOGY, HEAD OF THE LABORATORY OF BIOCHEMICAL GENETICS AND METABOLOMICS, RESEARCH INSTITUTE OF GENETIC AND MOLECULAR EPIDEMIOLOGY, KURSK STATE MEDICAL UNIVERSITY, KURSK, RUSSIAN FEDERATION. EMAIL: AZZZAR@YANDEX.RU.

АКТУАЛЬНОСТЬ

На сегодняшний день исследование ДНК, выделенной из объектов биологического происхождения, является общепринятой и наиболее информативной и точной процедурой в медицинской практике при диагностике моногенных, мультифакториальных заболеваний, судебно-медицинской криминалистической экспертизе идентификации личности и при определении биологического родства, а также при научных молекулярно-генетических исследованиях [5, 11]. Решающим преимуществом молекулярной диагностики является то, что объектом исследования является непосредственно молекула ДНК человека. Следовательно, диагностику можно проводить не только на тех тканях, где экспрессируется соответствующий ген, но практически на любых клетках организма, из которых можно выделить ДНК.

ДНК может служить источником информации о множестве аспектов строения и функций как организма в целом, так и его мельчайших составляющих [9]. Современные достижения в области секвенирования ДНК позволяют анализировать последовательности нуклеотидов, целые геномы, и расшифровывать закодированную в них информацию. Эти методы требуют образцов высокой чистоты, не содержащих примеси, способные нарушать процесс. Для получения необходимых результатов применяются разнообразные методики выделения ДНК, отличающиеся друг от друга длительностью, трудоёмкостью, экономической эффективностью и, конечно, концентрацией и качеством целевого продукта. В общем случае основная задача в процессе экстракции ДНК из биологического материала – разрушение клеток и клеточных органелл с последующим отделением целевого вещества от остального содержимого. Для этих целей применяются различные лизирующие, буферные растворы, хаотропные агенты, детергенты, ферменты, обладающие способностью расщеплять белки, органические растворители и их смеси. Также иногда могут использоваться особым образом синтезированные частицы с заданными свойствами, процедуры колоночного элюирования, микроцентрифугирования, высаливания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве материала для проведения экспериментов были использованы 94 образца крови из биобанка НИИ генетической и молекулярной эпидемиологии КГМУ.

Фенольно-хлороформный метод экстракции. Согласно протоколу, к 0.5 мл крови добавляют 0.5 мл PBS и центрифугируют при 12 тыс. об/мин 10 минут. Надосадочную жидкость сливают, добавляют 1мл PBS и центрифугируют при тех же условиях. Надосадочную жидкость вновь сливают. После добавления 200 мкл ТЕ-буфера пипетируют до растворения осадка и последовательно приливают 10 мкл 1% раствора SDS – додецилсульфата натрия – и 5 мкл протеиназы К. Пробирки инкубируют 12 часов при 37°C. Далее проводят четыре последовательных центрифугирования с фенолом и хлороформом – по 10 минут, 8 тыс. об/мин. Затем ДНК осаждают при помощи 95% ледяного этанола и центрифугируют при 14,3 об/мин в течение 10 минут.

Колоночный метод экстракции по протоколу ЭкстрактДНК-2 от НОМОТЕК. Перед началом работы в термостате устанавливают температуру +56°C и помещают в него пробирку с «Раствором 5 В», содержащим компоненты, необходимые для элюции ДНК в раствор. Вскрывают флакон с «Раствором 4 В», содержащим компоненты для отмывки ДНК, добавляют 75 мл 96% этилового спирта. Наносят пометку на крышке флакона о выполнении операции. Операция выполняется однократно при первом применении набора реагентов. Согласно протоколу, в подготовленные микроцентрифужные пробирки сначала вносят 100 мкл свежеприготовленной смеси для лизиса, затем такой же объём образца. Смесь для лизиса готовится путём смешивания растворов 1 В и 2 в соотношении 100×N к 5×N соответственно. Раствор 1 В содержит компоненты, необходимые для лизиса клеток. Раствор 2 содержит компоненты, необходимые для разрушения белков. Содержимое пробирок перемешивают 4-кратным переворачиванием, затем на вортексе 5 с, после чего инкубируют в термостате при 56°C в течение 10 минут, 2-3 раза дополнительно перемешивая на вортексе.

Далее в каждую пробирку вносят по 100 мкл 96% этанола, тщательно перемешивают на вортексе. Прибавляют по 400 мкл «Раствора 3 В», содержащего компоненты, необходимые для связывания ДНК с мембраной колонки, и перемешивают пере-ворачиванием и на вортексе до гомогенизации. По числу исследуемых образцов выставляют в штатив «Пробирки В» и в них «Колонки В», маркируют. Аккуратно переносят 700 мкл содержимого микроцентрифужной пробирки в «Колонку В» (помещенную в «Пробирку В»). Закрывают крышку «Колонки В» и центрифугируют при 10000 об/мин в течение 30 с. Использованную микроцентрифужную пробирку утилизируют.

Переносят «Колонку В» в новую «Пробирку В». «Пробирку В» с фильтратом утилизируют. Добавляют по 700 мкл «Раствора 4 В» в каждую «Колонку В» и центрифугируют 30 с при 10000 об/мин. Переносят «Колонку В» в новую «Пробирку В». «Пробирку В» с фильтратом утилизируют. Процедуру при необходимости повторяют. Центрифугируют «Колонку В» (помещенную в «Пробирку В») 2 минуты для полного удаления «Раствора 4 В». Переносят «Колонку В» в новую микроцентрифужную пробирку объемом 1.5 мл. «Пробирку В» с фильтратом утилизируют. Открытые пробирки с колонками инкубируют при комнатной температуре в течение 5 минут для испарения спирта, затем наносят в центр мембраны «Колонки В» (помещенной в микроцентрифужную пробирку) 50 мкл.

прогретого «Раствора 5 В». Закрывают крышку «Колонки В» и инкубируют в течение 3 минут при комнатной температуре. Центрифугируют «Колонку В» (помещенную в микроцентрифужную пробирку) 1 минуту при 10000 об/мин для сбора очищенной ДНК.

Данные по серии выделений по каждой методике, а именно концентрация и чистота образцов ДНК, были использованы для создания базы данных, которая затем была перенесена в программу STATISTICA для последующего анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Всего для статистического анализа были использованы данные по концентрации и чистоте 94 образцов ДНК, выделенной двумя методами: фенольно-хлороформная экстракция – первая группа, колоночный метод – вторая группа. Оценку нормальности распределения провели, используя тест Колмогорова-Смирнова, который для показателей концентрации ДНК обеих групп выявил ненормальное распределение ($P < 0,01$) (Рис.1).

Кроме того, тест выявил ненормальное распределение значений чистоты ДНК второй группы, в то время как распределение значений чистоты образцов ДНК первой группы не отличалось от нормального (Рис.2).

Так как 3 из 4 параметров показали ненормальное распределение, в дальней-

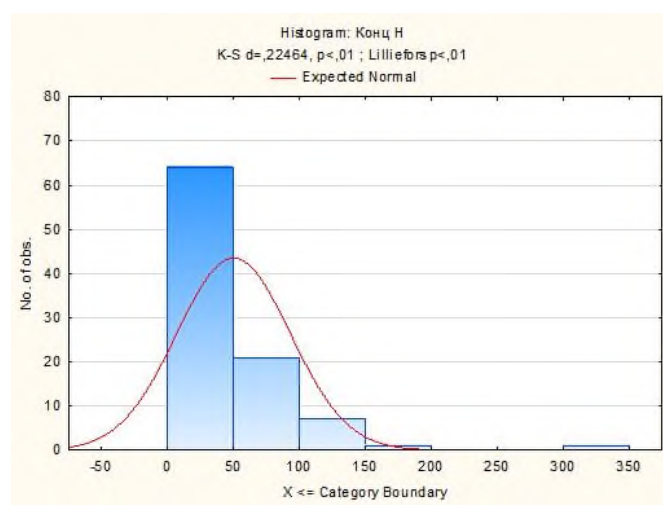
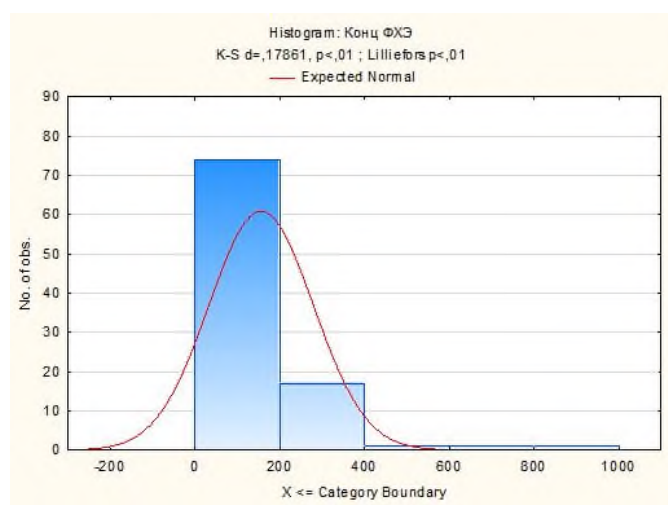


Рис. 1. Нормальность распределения концентраций двух групп образцов ДНК

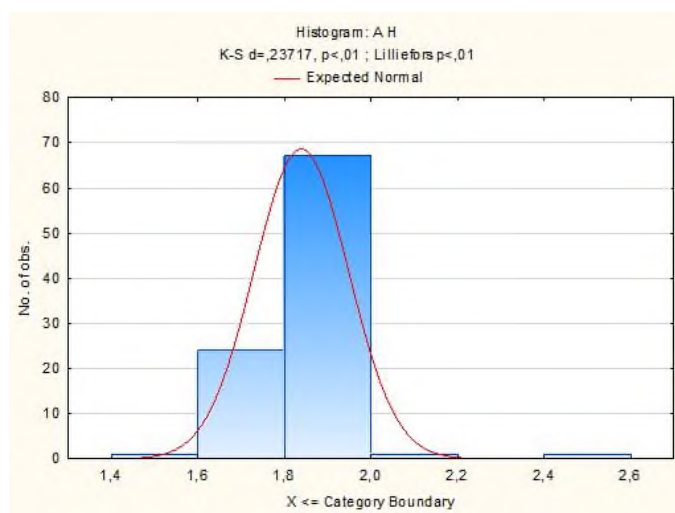
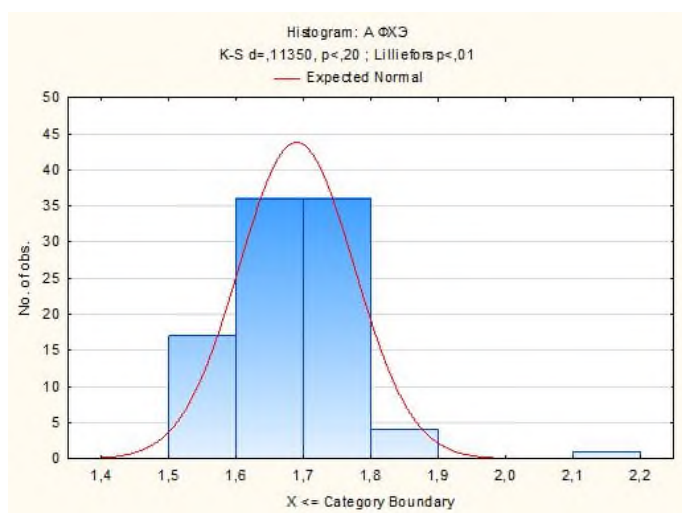


Рис. 2. Нормальность распределения чистоты двух групп образцов ДНК

Таблица 1. Сравнительный анализ концентрации и чистоты двух групп образцов ДНК

	Концентрация С, нг/мкл	Чистота А 260/280	Р
ФХЭ	119,50 (Q1=89,10; Q3=182,20)	1,69 (Q1=1,65; Q3=1,74)	$3,69 \times 10^{-16}$
Колоночный метод	39,05 (Q1=26,80; Q3=54,10)	1,84 (Q1=1,80; Q3=1,87)	$1,99 \times 10^{-15}$

шем были использованы методы непараметрической статистики.

Также был проведен анализ медианных концентраций ДНК, установивший для фенольно-хлороформного метода $Me=119,50$ нг/мкл ($Q1=89,10$; $Q3=182,20$), которая статистически значимо ($P=3,69 \times 10^{-16}$) превышала медиану концентрации ДНК, выделенной колоночным методом: $Me=39,05$ нг/мкл ($Q1=26,80$; $Q3=54,10$). С другой стороны, медиана чистоты растворов А 260/280 ДНК второй группы оказалась существенно ($P=1,99 \times 10^{-15}$) выше таковой у первой группы: $Me=1,84$ ($Q1=1,80$; $Q3=1,87$) и $Me=1,69$ ($Q1=1,65$; $Q3=1,74$) соответственно (Табл.1).

Фенольно-хлороформная экстракция. Из всех известных способов экстракции ДНК под «классическим» понимается фенольно-хлороформный метод, основанный на использовании различных органических растворителей, лизирующих агентов и

и протеиназы К [1]. Несмотря на то, что на него часто ссылаются как на золотой стандарт ввиду более высокой чистоты и большей длины получаемых фрагментов, метод имеет очевидное ограничение в виде токсичного характера фенола и хлороформа [8]. Фенол оказывает воздействие на эндокринную систему человека, повышает риск развития некоторых видов рака, может негативно влиять на репродуктивное здоровье [12]. Хлороформ легко попадает в организм с вдыхаемым воздухом или через кожу и быстро оказывает воздействие на основные системы органов, увеличивая риск развития заболеваний печени и почек наряду с другими многочисленными эффектами.

Первый этап выделения ДНК фенольно-хлороформным методом – добавление буферного раствора и центрифугирование. PBS – PHOSPHATE BUFFERED SALINE – буфер с

с изотонической осмолярностью и pH около 7.4 – поддерживает постоянное значение кислотности. Аналогично работает и смесь Tris - трис(гидроксиметил)аминометана с соляной кислотой.

Далее происходит добавление гипертонического лизирующего буфера. Часто используемая смесь – Tris-EDTA – обладает повышенной кислотностью (pH≈8) в сравнении с нормальными клеточными значениями. Кроме того, ЭДТА хелатирует катионы Mg^{2+} , необходимые для работы клеточных нуклеаз. По закону осмоса вода покидает клетку, клеточная мембрана разрушается. При этом интактной остаётся двойная ядерная мембрана. После ресуспендирования ядерного осадка в раствор, происходит добавление детергента и протеиназы К.

Детергенты – амфифильные молекулы, образующие в воде мицеллы. Своими гидрофобными участками они связывают гидрофобные домены мембранных белков, вытесняя молекулы липидов. Мембранные белки переходят в раствор в комплексе с детергентом. Нарушается целостность мембраны.

Протеиназа К – фермент класса гидролаз, обладающий способностью расщеплять и инактивировать клеточные нуклеазы и другие белки, связанные с ДНК, например, гистоны. Протеиназа К проявляет наибольшую активность при повышенных (50-60°C) температурах, поэтому раствор инкубируют в термостате меньше - 30-60 минут, чем при 37°C, когда время увеличивают до 12 часов.

Далее полученный лизат обрабатывают органическими растворителями и их сочетаниями и проводят серию центрифугирований. Фенол вызывает денатурацию белков, в следствии которой они выпадают из раствора в осадок. Хлороформ обеспечивает отделение водной фазы, содержащей целевую ДНК, от органической фазы. Может использоваться смесь фенол-хлороформ-изоамиловый спирт 25:24:1. Хлороформ помогает отделению белков и липидов, перемещая их в органическую фазу, тогда как изоамиловый спирт является пеногасителем, повышая эффективность процесса [5]. Такая комбинация растворителей помогает предотвратить загрязнение водной фазы фенолом, который может мешать дальнейшему проведению ПЦР,

если она потребуется.

На заключительном этапе ДНК осаждают ледяным спиртом, иногда в комбинации с ацетатом натрия. ДНК, обладая большим отрицательным зарядом, плохо растворяется в слабополярном спирте, поэтому выпадает в осадок, тогда как остатки детергента и других низкомолекулярных примесей остаются в растворе. Это обеспечивает финальную отмывку от остатков солей и фенола.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что фенольно-хлороформный метод позволяет выделить большее количество ДНК из цельной крови, чем колоночный метод. В исследовании Gnaneri M. и коллег [3]. сравниваются четыре протокола выделения ДНК из образцов крови: модифицированный фенол-хлороформный протокол, два метода с использованием соли и без использования ферментов, а также коммерческий набор Rosne Diagnostics GmbH. Выделенная с помощью этих протоколов ДНК была проанализирована с точки зрения временных затрат, качества и количества, токсичности и функциональности в методе ПЦР. Кроме того, качество и количество выделенной ДНК были проверены с помощью гель-электрофореза и спектрофотометрии NanoDrop. Было замечено, что эти методы не сильно отличаются по чистоте ДНК (A_{260}/A_{280}), но выход ДНК (нг ДНК/мкл) при использовании фенола/хлороформа был выше, чем при использовании других методов. Кроме того, метод с использованием фенола и хлороформа был самым токсичным и занимал больше времени, чем другие методы. Набор Rosne Diagnostics GmbH был самым дорогим из четырёх методов, но требовал меньше времени на экстракцию и был самым безопасным.

Интересные результаты были получены и в работе Favio Di Pietro и коллег [2], оценивших эффективность ФХЭ ДНК из длительно хранившихся замороженных образцов крови. Методику сравнили с протоколом, применяющим протеиназу К и центрифужные колоноки с мембранами на основе силикагеля, используя длительно хранившиеся при -20°C образцы цельной крови 1980 года, а также 82 образца высокой чистоты ($A_{260/280} = 1.79 \pm 0.32$, $A_{260/230} = 1.45 \pm 0.52$), собранных с 1980 по 1995. Также была оценена эффективность генотипиро-

вания при помощи RFLP-ПЦР и ASP-ПЦР для однонуклеотидного полиморфизма R53 Pro72ARG(rs1042522) и nTERT MNS16A VNTR соответственно. В результате 100% образцов были успешно протипированы. Кроме отмеченных надежности и эффективности, предложенный протокол ФХЭ отличался сокращением времени работы благодаря совмещению процессов экстракции и очистки, позволял работать при комнатной температуре.

Колоночный метод. Колоночный метод экстракции предполагает традиционный лизис клеток с последующей очисткой ДНК с использованием микроцентрифужных кремниевых колонок. Основа метода – аффинное связывание ДНК с материалом колонки, позволяющее отмыть её от сопутствующих примесей в серии центрифугирований [7]. Используются также хаотропные агенты, например, мочевины, изопропанол, хлорид гуанидиния и другие [10]. Хаотропный агент увеличивает энтропию системы, нарушая межмолекулярные водородные связи, которые обеспечивают упорядоченную спиральную структуру ДНК. Таким образом, ДНК становится более доступной для связывания с аффинным материалом. На завершающем этапе процедуры, когда завершены все стадии отмывки, применяют буферы для элюции, аналогичные таковым в предыдущем методе.

Первая стадия – лизис клеток и одновременное разрушение белков и инактивация клеточных нуклеаз. Для лизиса применяют буферы на основе солей гуанидиния, Tris и ЭДТА и другие [6]. Депротенинизацию обеспечивает протеиназа К или усовершенствованные версии фермента. После тщательного перемешивания образцы инкубируют в термостате. Время зависит от выбранной температуре по причинам, описанным в фенол-хлороформном методе.

После инкубирования к образцам добавляют буфер для связывания, содержащий хаотропные агенты, в комбинации с этанолом. Раствор переносят в колонки, на которых сорбируется ДНК. Колонки помещают в микроцентрифужные пробирки и центрифугируют. Несвязавшиеся с мембраной колонки примеси элюируются в пробирку. После центрифугирования пробирки с фильтратом утилизируют, а колон-

ки переносят в новые пробирки.

К образцам добавляют подходящий буфер для отмывки и проводят серию центрифугирований. Колонку с образцом каждый раз перемещают в новую пробирку. Далее пробирки оставляют в открытом виде для испарения возможных остатков спирта, компонентов буферов для отмывки и применяют буфер для элюции. После заключительно центрифугирования ДНК смывается с мембраны колонки и остаётся в растворе в пробирке.

ВЫВОДЫ

Выявлена существенная разница в концентрации и качестве раствора ДНК, получаемой двумя методами. Фенольно-хлороформный метод демонстрирует более высокую концентрацию, большую, чем в колоночном методе. В то же время, чистота ДНК, экстрагированной колоночным методом, значимо выше таковой фенольно-хлороформных образцов, что может оказаться существенным для дальнейших молекулярно-генетических исследований, проводимых с данными образцами.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи (интересы относительно публикации).

ЛИЧНЫЙ ВКЛАД АВТОРОВ

Иванов А.Ю. – экстракция ДНК из образцов крови, написание текста, статистическая обработка материала;

Азарова Ю.Э. – редактирование, дизайн окончательного варианта статьи.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Авторы заявляют об отсутствии финансирования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dawodu O., Erinle Q. EXTRACTION OF GENOMIC DNA FROM DIFFERENT PLANT TISSUES THROUGH PHENOL-CHLOROFORM METHOD. *ANNUAL RESEARCH & REVIEW IN BIOLOGY*. 2024;39. 51-60. DOI: 10.9734/ARRB/2024/v39

- 112155.
2. DI PIETRO F., ORTENZI F., TILIO M., CONCETTI F., NAPOLIONI V. GENOMIC DNA EXTRACTION FROM WHOLE BLOOD STORED FROM 15- TO 30-YEARS AT -20 °C BY RAPID PHENOL-CHLOROFORM PROTOCOL: A USEFUL TOOL FOR GENETIC EPIDEMIOLOGY STUDIES. *MOLECULAR CELLULAR PROBES*. 2011;25(1):44-8. DOI: 10.1016/j.mcp.2010.10.003.
 3. GHAHERI M, KAHRIZI D, YARI K, BABAIE A, SUTHAR RS, KAZEMI E. A COMPARATIVE EVALUATION OF FOUR DNA EXTRACTION PROTOCOLS FROM WHOLE BLOOD SAMPLE. *CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY (NOISY-LEGRAND)*. 2016;62(3):120-4.
 4. GILARDET A., LORD E., GARCÍA G.O., XENIKOU-DAKIS G., DOUKA K., WOOLLER M.J., ROWE T., MARTIN M.D., LE MOULLEC M., ANISIMOV M., HEINTZMAN P.D., DALÉN L. A HIGH-THROUGHPUT ANCIENT DNA EXTRACTION METHOD FOR LARGE-SCALE SAMPLE SCREENING. *MOLECULAR AND ECOLOGY RESOUR*. 2025;25(4):E14077. DOI: 10.1111/1755-0998.14077.
 5. HARIPRIYA K.S., SRINIVAS A., CHIKKALINGAIH M.H., YADAV A.K., VISHWANATH P., NATARAJ S.M., PRASHANT A. REVOLUTIONIZING DNA EXTRACTION: A COST-EFFECTIVE APPROACH FOR GENOMIC DNA RETRIEVAL FROM DRIED BLOOD SPOTS. *EJIFCC*. 2025;36(1):60-68.
 6. HOORZOOK K.B., BARNARD T.G. CULTURE INDEPENDENT DNA EXTRACTION METHOD FOR BACTERIAL CELLS CONCENTRATED FROM WATER. *METHODS X*. 2022;9:101653. DOI: 10.1016/j.mex.2022.101653.
 7. LIMA Â., SOUSA L.G.V., MACEDO F., MUZNY C.A., CERCA N. ASSESSING RECOVERY RATES OF DISTINCT EXOGENOUS CONTROLS FOR gDNA EXTRACTION EFFICIENCY USING PHENOL-CHLOROFORM OR SILICA-COLUMN BASED EXTRACTIONS. *JOURNAL OF MICROBIOLOGICAL METHODS*. 2022;203:106607. DOI: 10.1016/j.mimet.2022.106607.
 8. MOLBERT N., GHANAVI H.R., JOHANSSON T., MOSTADIUS M., HANSSON M.C. AN EVALUATION OF DNA EXTRACTION METHODS ON HISTORICAL AND ROADKILL MAMMALIAN SPECIMEN. *SCIENTIFIC REPORTS*. 2023;13(1):13080. DOI: 10.1038/s41598-023-39465-z.
 9. NELSON D.L., COX M.M. *LEHNINGER PRINCIPLES OF BIOCHEMISTRY*. NEW YORK:W.H. FREEMAN AND COMPANY, 2021;1237 p.
 10. PIAO X., YADAV V., WANG E., CHANG W., TAU L., LINDENMUTH B.E., WANG S.X. DOUBLE-STRANDED RNA REDUCTION BY CHAOTROPIC AGENTS DURING IN VITRO TRANSCRIPTION OF MESSENGER RNA. *MOLECULAR THERAPY NUCLEIC ACIDS*. 2022;29:618-624. DOI: 10.1016/j.omtn.2022.08.001.
 11. SILVA R.C.D., DE LIMA S.C., DOS SANTOS REIS W.P.M., DE MAGALHÃES J.J.F., MAGALHÃES R.N.O., RATHI B., KOHL A., BEZERRA M.A.C, PENA L. COMPARISON OF DNA EXTRACTION METHODS FOR COVID-19 HOST GENETICS STUDIES. *PLOS ONE*. 2023;18(10):E0287551. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0287551.
 12. XIONG Y., LI Z., XIONG X., LUO Z., ZHONG K., HU J., SUN S., CHEN C. ASSOCIATIONS BETWEEN PHENOL AND PARABEN EXPOSURE AND THE RISK OF DEVELOPING BREAST CANCER IN ADULT WOMEN: A CROSS-SECTIONAL STUDY. *SCIENTIFIC REPORTS*. 2025;15(1):4038. DOI: 10.1038/s41598-025-88765-z.