



ДОЛГОВРЕМЕННОЕ ХРАНЕНИЕ МОЛЕКУЛ ДНК ПРИ КОМНАТНОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ

Гарафутдинов Р.Р., Сахабутдинова А.Р., Чемерис А.В.

Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Россия, 450054, Уфа, пр. Октября, 71, e-mail: chemeris@anrb.ru

Резюме

Самым простым и наиболее распространенным способом длительного хранения образцов ДНК в настоящее время является хранение их замороженных растворов, имеющий, однако, ряд недостатков, среди которых разрушение молекул ДНК при их замораживании и оттаивании, а также расход электроэнергии и вероятность потери ценных образцов в случае возможных аварий. В этой связи предпочтительным является долговременное хранения образцов ДНК при комнатной температуре в высушенном состоянии, тем более, что намечается еще больший рост числа хранимых образцов ДНК в связи с планируемым сохранением в этой молекуле небиологических данных, о чем на Международном экономическом форуме 2019 г. заявлено в числе 10 важнейших инновационных технологий человечества в ближайшем будущем. При этом требуется исключение гидролиза и окисления молекул ДНК под действием воды и активных форм кислорода, что возможно достичь, помещая ДНК в инертную безводную атмосферу, в том числе в присутствии дополнительных ингредиентов в виде, например трегалозы, имитируя живую Природу, поскольку известно, что этот простой дисахарид, способный к стеклованию, защищает от неблагоприятных условий окружающей среды широкий круг организмов – ангидробионтов. В настоящее время существует ряд технологий, обеспечивающих долговременное хранение ДНК при комнатной температуре, в том числе доступных из коммерческих источников, но не все проблемы еще решены, что нашло свое отражение в данной обзорной статье.

Ключевые слова: ДНК, долговременное хранение ДНК, хранение данных в ДНК, трегалоза

Цитирование: Гарафутдинов Р.Р., Сахабутдинова А.Р., Чемерис А.В. Долговременное хранение молекул ДНК при комнатной температуре // Биомика. 2020. Т.12(4). С. 552-563. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-49

© Авторы

LONG-TERM ROOM TEMPERATURE STORAGE OF DNA MOLECULES

Garafutdinov R.R., Sakhabutdinova A.R., Chemeris A.V.

Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, 71 Prospect Oktyabrya, Ufa, 450054, Russia, E-mail: chemeris@anrb.ru

Resume

The simplest and most common method of long-term storage of DNA samples at present is the storage of their frozen solutions, which, however, has a number of disadvantages, including the destruction of DNA molecules during freezing and thawing, as well as energy consumption and the likelihood of losing valuable samples in the event of possible accidents. In this regard, long-term storage of DNA samples at room temperature in a dried state is preferable, especially since an even greater increase in the number of stored DNA samples is planned due to the planned preservation of non-biological data in this molecule, which is recognized at the International Economic Forum 2019 among the 10 most important innovative technologies as “DNA Data Storage” of the near future of mankind. Such storage requires the exclusion of hydrolysis and oxidation of DNA molecules under the action of water and reactive oxygen species, which

can be achieved by placing DNA in an inert anhydrous atmosphere, including in the presence of additional ingredients in the form of, for example, trehalose, imitating wildlife, since it is known that this simple disaccharide, capable of vitrification, protects a wide range of anhydrobiont organisms from adverse environmental conditions. Currently, there are a number of technologies that provide long-term storage of DNA at room temperature, including those available from commercial sources, but not all problems have yet been solved, which is reflected in this review article.

Keywords: DNA, long-term DNA storage, DNA data storage, trehalose

Citation: Garafutdinov R.R., Sakhabutdinova A.R., Chemeris A.V. Long-term room temperature storage of DNA molecules. *Biomics*. 2020. V. 12(4). P. 552-563. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-49 (In Russian)

© The Authors

Введение

Безусловно, самым удобным и простым способом долговременного хранения различных биополимеров, включая ДНК, является их нахождение при отрицательных температурах. Причем для длительного хранения рекомендуются температуры ниже -115°C , чтобы исключить повреждение биологических макромолекул кристаллами льда, поскольку при такой ультранизкой температуре лед сохраняет аморфную структуру и его рекристаллизации не происходит, тогда как при быстром охлаждении образцов, например, жидким азотом до -196°C , затем при температурах выше -115°C начинается потенциально опасный процесс рекристаллизации льда. Но для такого ультранизкотемпературного хранения требуются специальные довольно дорогостоящие морозильные камеры, расходующие к тому же значительное количество электроэнергии. Или необходимы сосуды Дьюра с жидким азотом, получение которого представляет собой также весьма энергоемкий процесс. Собственно, для большинства целей можно ограничиваться и температурой -85°C и даже -20°C ¹, но и в этом случае будет тратиться электроэнергия, и при хранении очень большого числа образцов это потребует немалых средств. К тому же нельзя исключать, что морозильная техника может выйти из строя или в результате серьезной аварии надолго прекратится подача электроэнергии, и тогда ценные образцы могут оказаться поврежденными или совсем пропасть. На такие случаи предусмотрена система резервного подключения баллонов со сжиженным углекислым газом, но это еще больше удорожает процесс хранения. Другими способами предотвратить потерю образцов служат источники бесперебойного питания и собственные генераторы электроэнергии, что также недешево. Поэтому совсем неудивительно, что значительное внимание стало уделяться разработке способов долговременного хранения

молекул ДНК при комнатной температуре, расходы на которое несравнимо меньше, нежели с использованием морозильного оборудования. Еще в 2010 г. фирма Biomatrix (о которой будет говориться ниже) вместе со Стэнфордским университетом подсчитали, что хранение ДНК при комнатной температуре может в год сэкономить 40 млн.квт-час электроэнергии и сократить выбросы углекислого газа на 18 тыс.тонн [Palmer, 2010]. Была опубликована специальная статья [Muller et al., 2016], в которой просчитаны всевозможные риски потери образцов нуклеиновых кислот, а также подсчитаны транспортные расходы для пересылки по миру Биобанковским сообществом в сухом льду ценных образцов, из чего становится ясно, что разработка способов долговременного хранения ДНК при комнатной температуре вполне оправдана, в том числе экономически.

Вообще, причин для долговременного хранения молекул ДНК немало. Это и хранение различных биологических образцов для научных исследований, а также медицинские и криминалистические банки данных с еще большими количествами хранимого материала, несущего в себе биологическую информацию. Но потенциально на первое место по объему (по количеству образцов) через некоторое время может выйти хранение молекул ДНК (олигонуклеотидов), предназначенных для хранения в них всевозможной небиологической информации, чему в последние годы уделяется повышенное внимание. Так, в докладе, подготовленном Всемирным экономическим форумом в 2019 г. (<https://www.weforum.org/agenda/2019/07/these-are-the-top-10-emerging-technologies-of-2019/>), среди прорывных инноваций, которые, как ожидается, радикально повлияют на глобальный социально-экономический порядок, под номером 9 упоминается технология “DNA Data Storage” или «Хранение данных в ДНК», что неудивительно, поскольку объем информации в мире накапливается с катастрофической быстротой, и нынешние системы хранения с ним могут через какое-то время просто не

¹ В одной из работ специально сравнили долговременное хранение ДНК при -20°C и при -80°C и не обнаружили особой разницы [Delhaes et al., 2014].

справиться, тогда как ДНК представляет собой весьма емкий носитель.

В данной статье будут рассмотрены способы хранения при комнатной температуре непосредственно самих молекул ДНК после их выделения из биологических объектов, а не длительное хранение таких объектов для последующего выделения из них ДНК, так как это должно составлять тему самостоятельной статьи. Также за пределами рассмотрения останутся молекулы РНК ввиду меньшей прочности и неприменимости, в том числе поэтому, для длительного хранения в них небологической информации. Так, в одной из статей Нобелевского лауреата по химии 2015 г. Т.Линдаля, получившего премию за свои работы по изучению деградации и репарации молекул ДНК, говорится, что фосфодиэфирные связи в ДНК в 200 раз прочнее, нежели таковые в РНК [Lindahl, 1996].

Безусловно, на эффективность хранения молекул ДНК сильно влияет степень чистоты выделенных препаратов, и в литературе можно встретить статьи, посвященные анализу качества хранимой ДНК в зависимости от используемого метода выделения и очистки [Psifidi et al., 2015]. Однако здесь этим вопросам внимание уделяться не будет, так как принимается, что все молекулы ДНК, предназначенные для длительного хранения, включая химически синтезированные олигонуклеотиды, имеют высокую степень чистоты (очистки), и присутствие в таких образцах любых ферментов так называемого нуклеинового обмена полностью исключено, кроме тех, что могут добавляться специально в виде соответствующих коммерческих наборов, улучшающих протекание ПЦР.

Поскольку ДНК подвержена деградации, в том числе при ее хранении в виде множества отдельных молекул, то прежде чем переходить к рассмотрению разнообразных способов долговременного хранения ДНК, следует коротко остановиться на физических и химических факторах, разрушающих данный биополимер.

Физические факторы, нарушающие целостность молекул ДНК

Молекулы ДНК представляют собой уникальный биополимер с огромным соотношением длины к толщине. Так, в стандартных условиях один виток двойной спирали ДНК, формируемый 10,5 нуклеотидами, имеет размер около 3,3 нм при диаметре спирали, равной приблизительно 2 нм. Длина же цельных молекул ДНК может составлять от приблизительно 1000 нм до сантиметровых величин. Например, если молекулу ДНК наиболее крупной (первой) хромосомы человека (≈ 249 млн. пар

нуклеотидов) можно было вытянуть в длину, то она составила бы более 8 см, превысив свой диаметр приблизительно в 40 млн. раз. При этом попутно можно заметить, что общая длина ДНК всех 46 хромосом человека достигает в одной соматической клетке мужской особи 205 см, а в женской – 208 см [Piovesan et al., 2019]. Для кольцевой хромосомы бактерии кишечной палочки *Escherichia coli* соотношение длины молекулы ДНК к толщине составляет 700 тысяч. Для ДНК фага лямбда размером 48,5 т.п.н., имеющей длину около 15 мкм, соотношение длины к толщине равно 7,5 тысяч, а для небольших плазмид оно будет составлять всего около 500, что позволяет лучше сохранять целостность выделенных молекул плазмидной ДНК. Также необходимо заметить, что на прочность молекул ДНК оказывает серьезное влияние их одно- или двухцепочечное состояние. Хотя в подавляющем числе организмов ДНК представлена в норме двухцепочечным биополимером, есть вирусы, которые значительную часть своего жизненного цикла проводят с ДНК в одноцепочечном состоянии. Также одноцепочечное состояние характерно для синтезированных химическим способом олигонуклеотидов, а сохранность последних, в том числе при комнатных температурах, представляет особый интерес в связи с нарастающими в мире намерениями долговременного хранения в молекулах ДНК небологической информации, о чем мы уже писали ранее [Сахабутдинова и др. (Sakhabutdinova et al.), 2019].

Несмотря на то, что молекула ДНК считается вполне гибкой, в изолированном виде в растворе крупная ДНК (с соотношениями длины и диаметра свыше десятков тысяч раз) сохранить свою нативность не в состоянии, поскольку различные физические воздействия способны фрагментировать цельные молекулы на части, размер которых зависит от разных обстоятельств [Гарафутдинов и др. (Garafutdinov et al.), 2016]. В то же время короткие фрагменты ДНК (олигонуклеотиды) с соотношением длины к толщине менее 10 механически весьма прочны и довольно устойчивы к любым гидродинамическим воздействиям.

Одной из главных причин механического разрушения ДНК, находящейся в водном растворе, служит гидродинамический удар, но его возникновение может быть следствием разных воздействий, при которых происходят перепады давления в соответствующих системах, вызванные быстрыми изменениями скоростей потоков жидкости. Также гидродинамический удар происходит при явлении кавитации, возникающей или в результате местного понижения давления в жидкости за счет увеличения скорости ее перемещения

(гидродинамическая кавитация), либо при прохождении звуковой волны большой интенсивности (акустическая кавитация). При длительном воздействии пикосекунды схлопывания мельчайших кавитационных пузырьков, заполненных паром самой жидкости, возникают гидравлические удары, сопровождаемые шумами, выделением тепла и разрушающие целостность молекул ДНК, находящихся в таком растворе. Впрочем, для секвенирования ДНК как раз требуется фрагментация этих молекул, в том числе с помощью физического воздействия и гидродинамических ударов, что мы уже рассматривали ранее [Матниязов и др. (Matniyazov et al.), 2014]. В процессе же непосредственного хранения ДНК подобные воздействия места не имеют, но при выводе из него, в том числе при растворении хранящейся в сухом виде ДНК, происходить могут.

Химические изменения, нарушающие целостность молекул ДНК

Помимо физических воздействий, ДНК подвергается и химическим изменениям, основными из которых следует считать гидролиз и окисление. Так, гидролиз приводит в большинстве случаев к апуринизации молекул ДНК, реже к апириминизации, дезаминированию цитозина. Окисление наиболее часто выражается в превращении гуанина в его 8-гидрооксипроизводное.

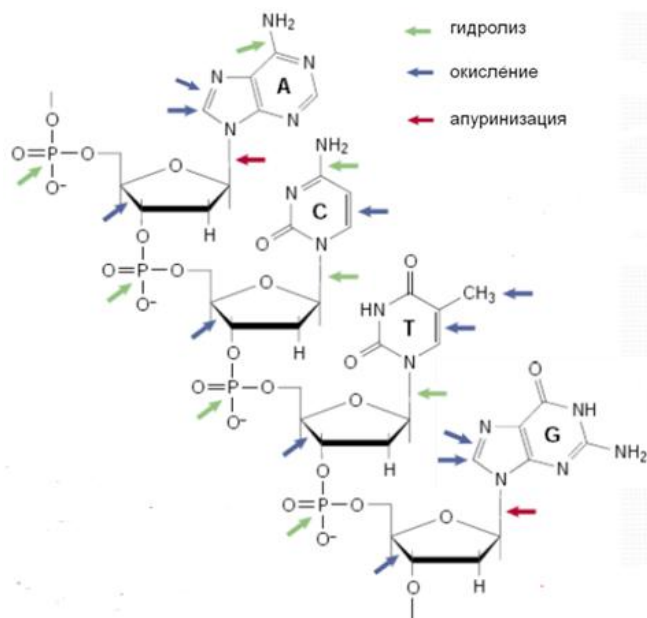


Рис. 1. Места разрушения цепи ДНК и модификации азотистых оснований

Fig. 1. Places of DNA chain destruction and places of modification of nitrogenous bases

После таких модификаций ДНК может измениться «неузнаваемо» и перестать быть тем биополимером, который должен был нести в себе как конкретную ожидаемую биологическую информацию, так и небиологические данные. Классический обзор процессов разрушения ДНК был подготовлен уже упоминавшимся выше Т.Линдалем [Lindahl, 1993] и нет смысла его здесь воспроизводить. Но на некоторых моментах стоит остановиться. Так, деградация ДНК происходит и под действием озона [Colotte et al., 2011], в ходе процесса, носящего название озонолиз [Cataldo, 2006]. Довольно подробное исследование происходящих структурных изменений ДНК при длительном хранении этой молекулы, в том числе при повышенных температурах и меняющейся влажности, проведено французскими авторами [Bonnet et al., 2010].

Таким образом, для долговременного хранения ДНК требуется исключить или, по крайней мере, минимизировать контакт этого биополимера с воздухом, в котором значительную долю составляет кислород; наиболее опасными при этом являются так называемые активные формы кислорода. Также необходимо исключить контакт ДНК с водой, но это сделать непросто, поскольку ДНК – обводненная молекула, и на каждый нуклеотид при 50% влажности приходится около 8 - 10 молекул прочно связанной с ними воды, тогда как полностью гидратированная ДНК содержит около 20 молекул воды на нуклеотид. При этом сухая ДНК все равно удерживает 3 - 4 молекулы воды на нуклеотид, и это тот минимум, который нужно поддерживать с помощью разных ухищрений, о которых и пойдет речь дальше, равно как и добиваться максимального исключения доступа кислорода. Однако сначала следует коснуться тривиальных способов долговременного (массового) хранения молекул ДНК.

Тривиальные способы долговременного хранения ДНК

Пожалуй, самым распространенным способом долговременного хранения ДНК является замораживание ее водных растворов при -20°C . Однако многократные циклы оттаивания/замораживания отрицательно сказываются на структурной целостности данной молекулы, что отмечалось еще в середине 1960-х гг. [Shikama, 1965]. Чуть позже отечественными авторами применительно к разрушению ДНК многократными воздействиями замораживания/оттаивания был предложен специальный термин "криолиз" (cryolysis), протекание которого они контролировали с помощью измерений вязкости раствора ДНК, оценкой коэффициента седиментации ДНК в аналитической ультрацентрифуге и электронной микроскопией отдельных молекул ДНК [Lyscov, Moshkovsky, 1969].

Некоторым решением проблемы такого криолиза является хранение ДНК в аликвотах, которые, впрочем, увеличивают объем пространства, используемого для хранения. Другим способом предотвратить разрушение ДНК при низкотемпературном хранении и льдообразовании является помещение ДНК в раствор 50% глицерина, показавшее в частности, что после 16 циклов замораживания и оттаивания качество таких препаратов ДНК не изменилось [Schaudien et al., 2007]. Но в любом случае подобное хранение требует наличия морозильников и трат электроэнергии, о чем говорилось выше.

Наиболее простым способом долговременного хранения ДНК, которое может осуществляться при комнатной температуре без заметного изменения свойств этого биополимера, является перевод ДНК в твердую фазу, а именно в спиртовой осадок. Неудобство такого способа заключается в необходимости для дальнейшей работы проведения ряда процедур для превращения осадка ДНК в раствор – центрифугирование, удаление водно-спиртового супернатанта, удаление остатков спирта и добавление воды (буфера) и непосредственно само растворение, которое может быть не быстрым, что зависит от размера хранимых (выделенных ранее) молекул ДНК, и при этом в некоторых случаях потребовать довольно интенсивного перемешивания, способного приводить к кавитации и прочим гидродинамическим воздействиям. Можно еще вспомнить оригинальный способ временного хранения ДНК в агарозном геле в 70% этаноле при 25°C, после чего через четыре дня был успешно осуществлен перенос ДНК из геля на мембранный фильтр, и проводилась блот-гибридизация [Jacobs, Neilan, 1995; Laniel et al., 1997].

Другим простым способом долговременного хранения ДНК при комнатной температуре является ее сохранение в виде сухого вещества, высушенного током воздуха, в вакууме или с помощью лиофилизации. При таком хранении для проведения исследований также необходимо переводить ДНК в водный раствор со всеми вытекающими последствиями, о которых говорилось выше. В одной из работ сообщается, что после высушивания в вакууме геномной ДНК ряда видов бактерий, полипропиленовые пробирки с сухой ДНК наполнялись аргоном 99,999% чистоты и хранились в течение 22 месяцев при +5°C, после чего извлеченная ДНК показала свою пригодность для проведения с ней ПЦР [Trappmann et al., 2004].

Здесь, пожалуй, стоит напомнить, что самой «старой»² сухой ДНК является нуклеин из спермы

лососа, выделенный еще Ф.Мишером полтора столетия назад и хранящийся в музее в Тюбингене (Германия) [Byrne, Dahm, 2019], все это время пребывавший, скорее всего, при комнатной температуре. К слову сказать, у нас также имеются довольно старые коммерческие препараты ДНК быка и курицы разных фирм, которым 50 и 38 лет соответственно, при этом большую часть этого времени также находившиеся при температуре окружающей среды и сохранившие свою пригодность, по крайней мере, для проведения ПЦР (Гарафутдинов и др., статья готовится к печати).

Но все же подходы с рядовым высушиванием водных экстрактов ДНК не могут считаться самыми удобными способами, обеспечивающими долговременное хранение ДНК при комнатной температуре для вышеозначенной цели хранения в ДНК небиологической информации.

Хранение обезвоженной ДНК

Известно, что глубокое обезвоживание, или ангидриобиоз, обеспечивает выживание отдельных организмов в самых экстремальных условиях, вплоть до температуры абсолютного нуля. К таковым относятся тихоходки, или иначе маленькие водяные медведи из группы Tardigrada – микроскопические позвоночные, способные уменьшить концентрацию воды в своем теле до 1-2% и перенести фактически космический холод и космическое излучение. Некоторое время назад у одного из видов тихоходок был обнаружен белок, получивший название Dsup (Damage suppressor), защищающий в том числе от радиации. Проведенный недавно его компьютерный анализ показал, что этот белок внутренне неупорядочен, что позволяет ему корректировать свою структуру в соответствии с формой ДНК, экранируя эту молекулу [Mínguez-Toral et al., 2020]. Высказано предположение, что белок Dsup найдет применение в биотехнологии. При этом нельзя исключать, что он окажется пригодным и для длительного хранения ДНК. Но пока для этого используются более простые вещества типа дисахарида трегалозы, которая накапливается у многих ангидриобионтов, в том числе в спорах некоторых бактерий, способствуя переживанию ими неблагоприятных условий. Трегалоза представляет собой простой дисахарид - α -D-глюкопиранозил- α -D-глюкопиранозид, способный переходить в стеклообразное состояние, тем самым образуя защитную капсулу. А у тихоходок количество

ДНК, возраст которой может исчисляться тысячелетиями и даже миллионнолетиями, но такая древняя ДНК выделена в наши дни и лишь образцы, из которых она выделена, имеют солидный возраст.

² Во избежание недоразумений, вынуждены еще раз напомнить, что в данной статье не идет речь о древней

трегалозы в организме при неблагоприятных условиях вообще может достигать четверти веса [Bradbury, 2001].

Так, имитируя живую природу, американская фирма Biomatrix, Inc. выпустила целую линейку продуктов на основе трегалозы для длительного хранения при комнатной температуре ДНК, РНК и других биопрепаратов, используя SampleMatrix Technology. Осенью 2009 г. Biomatrix совместно с известной фирмой Qiagen анонсировали соответственно продажи продуктов DNASTable и его аналога QIASafe для долговременного хранения ДНК. Оба продукта поставлялись в разных вариантах – в пробирках и в планшетах, покрытых изнутри высушенной трегалозой (и, возможно, еще какими-то компонентами), а также в растворе. Перед длительным хранением после добавления ДНК (до 30 мкг на образец) в первые типы емкостей или смешивания в последнем случае ДНК с готовым раствором DNASTable или QIASafe, такие препараты требовалось высушить. Для выведения такой ДНК из хранения требовалось в соответствующие емкости просто добавить воды.

Спустя некоторое время специалистами фирмы Biomatrix была опубликована статья, показывающая преимущество использования DNASTable продуктов для длительного хранения ДНК [Clement et al., 2012]. Канадскими авторами с использованием 96-ти луночного DNASTable планшета был проведен длительный эксперимент по хранению ДНК в течение 4 лет при комнатной температуре и при 56°C в течение 4 месяцев [Ivanova, Kuzmina, 2013]. Для сравнения, ими параллельно велся анализ ДНК, хранимой с трегалозой домашнего изготовления, а также с поливиниловым спиртом. В целом наилучшие результаты в их руках показал именно коммерческий продукт DNASTable. Хорошо себя зарекомендовал реактив DNASTable и для хранения криминалистических образцов ДНК [Howlett et al., 2014], равно как и QIASafe для этих же целей [Frippiat, Noel, 2014].

Однако компания Qiagen с 2014 г. перестала поставлять свой вариант этого товара под названием QIASafe. Что касается Biomatrix, то эта фирма, похоже, в 2019 г. приостановила свою деятельность, и на ее web-сайте (<https://www.biomatrix.com>) для DNASTable и всех прочих продуктов установлен статус “discontinued” без указания причин.

В одной из работ проводилось сравнение качества хранимых при комнатной температуре высушиваемых в течение суток 8 образцов ДНК, помещенных в ячейки 96-ти луночного планшета SampleMatrix (DNASTable) фирмы Biomatrix и в пробирках GenTegra DNA фирмы GenVault Corporation (дочерняя компания IntegenX) с их

аликвотами, хранящимися в виде замороженных растворов при -20°C [Wan et al., 2010]. Такое хранение продолжалось, к сожалению, не очень долго (три недели), после чего с этой ДНК проводились разные анализы – амплификация с помощью ПЦР длинных (15,1 т.п.н.) и коротких (531 п.н.) ампликонов с секвенированием методом Сэнгера последнего типа ампликонов, а также гибридизации хранящейся ДНК с ДНК-чипами. В итоге оказалось, что хранение при комнатной температуре высушенных таким образом образцов ДНК не сказалось отрицательно на качестве этого биополимера.

Раз уже речь зашла о пробирках GenTegra DNA, то следует и им уделить определенное внимание, тем более, что они до сих пор производятся (<https://nbsscscientific.com/product/gentegra-dna/>). Так, фирма GenVault, подав в патентное ведомство США 12 сентября 2008 г. Provisional Application, через месяц анонсировала выпуск нового продукта GenTegra DNA, представляющего собой пробирки и планшеты с помещенными в них дисками из специального материала, пропитанного некими реагентами, улучшающими (предохраняющими молекулы ДНК от окисления, гидролиза и пр.) долговременное хранение образцов (до 25 мкг ДНК) при комнатной температуре. Состав этих реагентов не раскрывался, но, судя по патентам этой фирмы под номерами US 8,951,719 и US 9,840,731, в которых упоминаются борная кислота, гистидин, глицерин, 1,2-пентандиол, этиленгликоль и другие субстанции, некие комбинации данных веществ могут присутствовать на этих дисках. Для долговременного хранения при комнатной температуре диски с нанесенной на них ДНК требовалось высушить, а для выведения из хранения просто добавить воды. В руководстве к использованию GenTegra DNA приводился пример хранения ДНК крупного размера (около 40 т.п.н.) в течение 6 месяцев при 25°C, 37°C, 56°C и 76°C, после чего проводился гель-электрофорез, из которого можно было видеть, что качество препаратов ДНК абсолютно не изменилось. Собственно, это был результат из ранее опубликованной статьи специалистов фирмы [McDevitt et al., 2014]. В качестве успешного применения GenTegra DNA для длительного хранения образцов для ДНК-криминалистики и для других целей можно указать на следующие публикации [Frippiat et al., 2011; Montgomery et al., 2019]. В одной из работ проводилось сравнение GenTegra DNA с системой хранения ДНК DNAShell французской фирмы Imagenе [Clermont et al., 2014], к рассмотрению которой ниже перейдем.

На web-сайте фирмы Imagenе (<http://www.imagene.eu>) приведена довольно подробная информация о предлагаемом ими способе

долговременного хранения ДНК при комнатной температуре. Еще более подробно их способ описан в патенте, переведенном на национальную фазу Российской Федерации и получившим номер RU 2507003 с датой начала отсчета срока действия патента 10.03.2009 г. Патентообладателем числится ИМАЖЕН (FR). Для долговременного хранения ДНК помещается в стеклянную емкость, которая после перевода ДНК в сухое состояние вставляется в капсулу из тонкостенной нержавеющей стали с плотно подогнанной крышкой, между которыми лазерной сваркой формируется сварной шов, полностью исключая влияние атмосферы внешней среды, после того как эта емкость предварительно заполняется инертным газом. С целью четкой идентификации таких капсул на дне также лазером делается соответствующая гравировка. После этого в сохранности помещенной в такую капсулу ДНК можно быть уверенными. При необходимости отобрать часть хранимой ДНК предусмотрен порядок действий, позволяющий затем также герметично укупорить данную капсулу.

Возвращаясь к цитированной выше статье [Clermont et al., 2014] нужно отметить, что при хранении в течение месяца при комнатной температуре особых различий между вариантами DNAShell и GenTegra DNA не было, однако при хранении при повышенных температурах (76°C) и 50% влажности, приводящих к ускоренному старению, составившему порядка 100 лет, DNAShell технология показала заметное преимущество. При этом также было отмечено, что добавление трегалозы при таком «ускоренном» хранении не привело к деградации ДНК, тогда как в отсутствие этого дисахарида деградация все же имела место. Хорошо показал себя способ DNAShell и в других исследованиях [Liu et al., 2015; Washetine et al., 2018; 2019].

Безусловно, технология DNAShell фирмы Imogene по стоимости значительно превосходит все описанные выше, однако она гарантирует очень высокую сохранность ДНК на протяжении очень длительного времени, что привлекло внимание американской фирмы Twist Bioscience – одного из мировых лидеров в разработке способов хранения небиологической информации в ДНК, где длительное хранение синтезированных молекул олигонуклеотидов является одним из краеугольных камней в этой инновационной технологии, и поэтому между ними заключено соглашение о сотрудничестве в этом важном вопросе, который, как уже говорилось выше, включен в перечень прорывных технологий человечества на ближайшую перспективу. В этой связи следует уделить внимание сохранности при комнатной температуре не обычной ДНК, а

синтезированных химическим путем олигонуклеотидов, тем более, что работ по оценке эффективности их хранения, как это не удивительно, крайне мало.

Проведенный анализ сохранности коротких олигонуклеотидов при многократных циклах замораживания/оттаивания показал некоторую зависимость ее от их длины и нуклеотидного состава [Davis et al., 2000], что, впрочем, не удивительно. При этом условия замораживания и оттаивания были довольно суровыми – жидкий азот (-196°C) и водяная баня 65°C. Было обнаружено, что уже после 20 циклов появлялись видимые с помощью времяпролетной масс-спектрометрии продукты деградации пятизвенных гомополимерных нуклеотидов, представленных каждым азотистым основанием по отдельности. Причем, олигонуклеотид GGGGG показал наихудший результат в виде 90% разрушения, тогда как наиболее высокую 99%-ную сохранность продемонстрировал олигонуклеотид TTTTT, но от подобного ему более длинного олигонуклеотида TTTTTTTTTT при таких же условиях осталось в целости лишь 40%. В еще одной работе с помощью ПЦР в реальном времени изучалась сохранность олигонуклеотидных праймеров и гибридационных зондов, а также контрольной плазмидной ДНК после трех месяцев их хранения в 96-ти луночных планшетах в сухом виде вместе с трегалозой, или желатином, или полиэтиленгликолем при комнатной температуре, либо для ускоренного старения при 50°C [Zagon et al., 2012]. Из всех вариантов наиболее успешным хранение было в присутствии трегалозы. Другие авторы провели схожую работу по оценке сохранности праймеров и гибридационных зондов после года их хранения при комнатной температуре, в том числе со стабилизаторами в виде трегалозы и ксантана, контролируя процесс также с использованием ПЦР в режиме реального времени [Rombach et al., 2014]. Наилучшую сохранность, как и в вышеописанном случае, продемонстрировали образцы с трегалозой.

Прочие способы долговременного хранения ДНК

Завершая рассмотрение способов долговременного хранения ДНК при комнатной температуре, стоит коснуться еще нескольких работ, в которых делались подобные попытки. Так, в одной из работ [Shirkey et al., 2003] плазмидная ДНК высушивалась в 1,5 мл пробирках и в атмосфере азота при комнатной температуре помещалась в бокс над пятиокисью фосфора, известного своей способностью поглощать влагу из воздуха, однако через 7 суток количество ДНК, контролируемое гель-электрофорезом в виде полос, соответствующих разным формам плазмид, сильно уменьшилось.

Подобный эффект разрушения ДНК вместо ее сохранения над пятиокисью фосфора отмечали и другие авторы [Bonnet et al., 2010]. Иной подход заключался в сорбции бактериальной ДНК на гидроксиапатите с последующим хранением при 37°C, продолжавшимся до 3 месяцев, в том числе в присутствии белков и ДНКазы I, после чего в результате элюции с помощью ЭДТА эту ДНК удавалось амплифицировать с помощью ПЦР, тогда как при хранении такой же ДНК в растворе выявить соответствующий ампликон уже не получалось через три недели хранения [Brundin et al., 2013]. Эти авторы объяснили свой выбор гидроксиапатита тем, что он является основным компонентом костей и дентина, а древняя ДНК, как известно, лучше всего сохраняется именно в подобных артефактах.

Большой цикл исследований по разработке способов инкапсулирования ДНК выполнен швейцарскими авторами. Так, ими была применена технология заключения ДНК в кремниевую оболочку, исключающую доступ активных форм кислорода [Paunescu et al., 2013; Grass et al., 2015]. Для защиты ДНК еще и от ультрафиолетового излучения на такие кремниевые частицы с ДНК был нанесен слой двуокиси титана, [Paunescu et al., 2014]. Позже кремниевым частицам с ДНК были приданы магнитные свойства [Chen et al., 2019]. Некоторым недостатком этих способов служит использование для извлечения хранимой ДНК забуференного раствора фтористого водорода, являющегося довольно опасным соединением. Недавно этими же авторами была осуществлена стабилизация синтетических двуцепочечных молекул ДНК длиной 148 п.н. с помощью солей щелочноземельных металлов – хлоридов бария, стронция, кальция, магния, а также фосфата кальция, что в том числе сопровождалось ускоренным старением ДНК путем воздействия в течение 8 дней высокой температуры (70°C) и влажности (50%) [Kohl et al., 2020]. Лучшие результаты по сохранности ДНК показал из них хлорид магния. В этой же статье справедливо отмечается, что необходимо при длительном хранении ДНК при комнатной температуре учитывать три главных показателя – сохранность, количество хранимой ДНК на единицу объема, обращение с такой ДНК. Установив 4 уровня удобства для каждого показателя и сравнив нахождение хранимой ДНК в: а) костном материале; б) растворе; в) наночастицах; г) в присутствии солей, было показано, что, если учитывать все эти параметры, то хранение ДНК с солями щелочноземельных металлов оказывается предпочтительным. Однако вряд ли оно может обеспечить сохранность на годы и тем более десятилетия, не говоря уже о столетиях и

тысячелетиях, целью которой является хранение в ДНК небιологических данных.

Заключение

Из изложенного выше материала хорошо видно, что вопросам долговременного хранения молекул ДНК при комнатной температуре в последнее десятилетие стал проявляться повышенный интерес, и это не удивительно, учитывая резко увеличивающееся количество хранимых образцов. И если раньше морозильная техника справлялась с имевшимся объемом, включая сюда и экономическую составляющую вопроса, то в будущем, принимая во внимание твердые намерения хранить в ДНК разнообразную небιологическую информацию, ситуация может усугубиться настолько, что неизбежность хранения образцов ДНК при комнатной температуре выйдет на первый план. При этом в последнее время изменились и требования к хранению ДНК в виде его продолжительности. Причем, качество хранимых препаратов в течение долгого времени должно соответствовать исходному. Все это вместе породило значительный интерес к разработке новых способов и технологий длительного хранения образцов ДНК при комнатной температуре как наиболее дешевому варианту даже с учетом затрат на организацию подобного хранения. Можно не сомневаться, что поиск новых подходов к экономичному долговременному хранению молекул ДНК в условиях, обеспечивающих их сохранность на долгие годы, и удобство обращения с ними будет продолжен.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 20-07-00222.

Литература

1. Гарафутдинов Р.Р., Галимова А.А., Сахабутдинова А.Р., Чемерис А.В. ПЦР-анализ специфичной к последовательности ультразвуковой фрагментации ДНК // Молекулярная биология. 2016. Т. 50. № 2. С. 272-278. DOI: 10.7868/S0026898416020051
2. Матнязов Р.Т., Чемерис Д.А., Кулуев А.Р., Зубов В.В., Чемерис А.В. Разнообразие способов получения случайным образом фрагментированной ДНК // Биомика. 2014. Т. 6. № 3. С. 155-166.
3. Сахабутдинова А.Р., Михайленко К.И., Гарафутдинов Р.Р., Кирьянова О.Ю., Сагитова М.А., Сагитов А.М., Чемерис А.В. Небиологическое применение молекул ДНК // Биомика. 2019. Т.11(3). С. 344-377. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2019-28
4. Bonnet J., Colotte M., Coudy D., Couallier V., Portier J., Morin B., Tuffet S. Chain and conformation

- stability of solid-state DNA: implications for room temperature storage // *Nucleic Acids Res.* 2010 Mar;38(5):1531-46. doi: 10.1093/nar/gkp1060
5. Bradbury J. Of tardigrades, trehalose, and tissue engineering // *Lancet.* 2001. V.358(9279). P.392. doi: 10.1016/S0140-6736(01)05595-7
 6. Brundin M., Figdor D., Sundqvist G., Sjögren U. DNA binding to hydroxyapatite: a potential mechanism for preservation of microbial DNA // *J. Endod.* 2013. V.39(2). P.211-216. doi: 10.1016/j.joen.2012.09.013
 7. Byrne J., Dahm R. Friedrich Miescher and the 150th anniversary of the discovery of DNA // *Biomics.* 2019. V.11(3). P. 249-258. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2019-23
 8. Cataldo F. DNA degradation with ozone // *Int. J. Biol. Macromol.* 2006. V.38(3-5). P.248-254. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2006.02.029
 9. Chen W.D., Kohll A.X., Nguyen B.H., Koch J., Heckel R., Stark W.J., Ceze L., Strauss K., Grass R.N. Combining Data Longevity with High Storage Capacity—Layer - by - Layer DNA Encapsulated in Magnetic Nanoparticles // *Advanced Functional Materials.* 2019. V.29(28). 1901672. doi.org/10.1002/adfm.201901672
 10. Clement O., Whitney S., Muller-Cohn J., Muller R. Following nature's lead: generating compounds for stabilizing biomolecules // *Biopreserv. Biobank.* 2012. V.10(4). P.395-402. doi: 10.1089/bio.2012.0022
 11. Clermont D., Santoni S., Saker S., Gomard M., Gardais E., Bizet C. Assessment of DNA encapsulation, a new room-temperature DNA storage method // *Biopreserv. Biobank.* 2014. V.12(3). P.176-183. doi: 10.1089/bio.2013.0082
 12. Colotte M., Coudy D., Tuffet S., Bonnet J. Adverse effect of air exposure on the stability of DNA stored at room temperature // *Biopreserv. Biobank.* 2011. V.9(1). P.47-50. doi: 10.1089/bio.2010.0028
 13. Davis D.L., O'Brien E.P., Bentzley C.M. Analysis of the degradation of oligonucleotide strands during the freezing/thawing processes using MALDI-MS // *Anal. Chem.* 2000. V.72(20). P.5092-5096. doi: 10.1021/ac000225s
 14. Delhaes L., Filisetti D., Brenier-Pinchart M-P., Pelloux H., Yéra H., Dalle F., Sterkers Y., Varlet-Marie E., Touafek F., Cassaing S., Bastien P. Freezing and storage at -20 °C provides adequate preservation of *Toxoplasma gondii* DNA for retrospective molecular analysis // *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2014. V.80(3). P.197-199. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2014.08.007
 15. Fripiat C., Noel F. Efficiency of a novel forensic room-temperature DNA storage medium // *Forensic Sci. Int. Genet.* 2014. V.9. P.81-84. doi: 10.1016/j.fsigen.2013.11.009
 16. Fripiat C., Zorbo S., Leonard D., Marcotte A., Chaput M., Aelbrecht C., Noel F. Evaluation of novel forensic DNA storage methodologies // *Forensic Sci. Int. Genet.* 2011. V.5(5). P.386-392. doi: 10.1016/j.fsigen.2010.08.007
 17. Grass R.N., Heckel R., Puddu M., Paunescu D., Stark W.J. Robust chemical preservation of digital information on DNA in silica with error-correcting codes // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2015. V.54(8). P.2552-2555. doi: 10.1002/anie.20141137
 18. Howlett S.E., Castillo H.S., Gioeni L.J., Robertson J.M., Donfack J. Evaluation of DNA stable for DNA storage at ambient temperature // *Forensic Sci. Int. Genet.* 2014. V.8(1). P.170-178. doi: 10.1016/j.fsigen.2013.09.003
 19. Jacobs D., Neilan B.A. Long-term preservation of DNA in agarose gels using 70% ethanol // *Biotechniques.* 1995. V.19(6). P.892-894.
 20. Ivanova N.V., Kuzmina M.L. Protocols for dry DNA storage and shipment at room temperature // *Mol. Ecol. Resour.* 2013. V.13(5). P.890-898. doi: 10.1111/1755-0998.12134
 21. Kohll A.X., Antkowiak P.L., Chen W.D., Nguyen B.H., Stark W.J., Ceze L., Strauss K., Grass R.N. Stabilizing synthetic DNA for long-term data storage with earth alkaline salts // *Chem. Commun. (Camb.).* 2020. V.56(25). P.3613-3616. doi: 10.1039/d0cc00222d
 22. Laniel M.A., el-Amine M., Boire G., Ménard H.A. Southern blotting of long-term preserved DNA // *Biotechniques.* 1997. V.22(4). P.595-596. doi: 10.2144/97224bm02
 23. Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA // *Nature.* 1993. V.362(6422). P.709-715. doi: 10.1038/362709a0
 24. Lindahl T. The Croonian Lecture, 1996: endogenous damage to DNA // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1996. V.351(1347). P.1529-1538. doi: 10.1098/rstb.1996.0139
 25. Liu X., Li Q., Wang X., Zhou X., He X., Liao Q., Zhu F., Cheng L., Zhang Y. Evaluation of DNA/RNAs shells for room temperature nucleic acids storage // *Biopreserv. Biobank.* 2015. V.13(1). P.49-55. doi: 10.1089/bio.2014.0060
 26. Lyscov V.N., Moshkovsky Y. DNA cryolysis // *Biochim. Biophys. Acta.* 1969. V.190(1). P.101-110. doi: 10.1016/0005-2787(69)90158-0
 27. McDevitt S.L., Hogan M.E., Pappas D.J., Wong L.Y., Noble J.A. DNA storage under high temperature conditions does not affect performance in human leukocyte antigen genotyping via next-generation sequencing (DNA integrity maintained in extreme conditions) // *Biopreserv. Biobank.* 2014. V.12(6). P.402-408. doi: 10.1089/bio.2014.0036
 28. Mínguez-Toral M., Cuevas-Zuviría B., Garrido-Arandia M., Pacios L.F. A computational structural study on the DNA-protecting role of the tardigrade-

- unique Dsup protein // *Sci Rep.* 2020. V.10(1):13424. doi: 10.1038/s41598-020-70431-1
29. Montgomery M.C., Berka J., Weimer E.T. Suitability of dried DNA for long-range PCR amplification and HLA typing by next-generation sequencing // *Hum. Immunol.* 2019. V.80(2). P.135-139. doi: 10.1016/j.humimm.2018.12.002
30. Muller R., Betsou F., Barnes M.G., Harding K., Bonnet J., Kofanova O., Crowe J.H., International Society for Biological and Environmental Repositories (ISBER) Biospecimen Science Working Group. Preservation of Biospecimens at Ambient Temperature: Special Focus on Nucleic Acids and Opportunities for the Biobanking Community // *Biopreserv. Biobank.* 2016. V.14(2). P.89-98. doi: 10.1089/bio.2015.0022
31. Palmer R. Companies hope to bring DNA storage in from the cold // *Nature Medicine.* 2010. V.16(10). P.1056-1057.
32. Paunescu D., Mora C.A., Puddu M., Krumeich F., Grass R.N. DNA protection against ultraviolet irradiation by encapsulation in a multilayered SiO₂/TiO₂ assembly // *J. Mater. Chem. B.* 2014. V.2(48). P.8504-8509. doi: 10.1039/c4tb01552e
33. Paunescu D., Puddu M., Soellner J.O.B., Stoessel P.R., Grass R.N. Reversible DNA encapsulation in silica to produce ROS-resistant and heat-resistant synthetic DNA 'fossils' // *Nat. Protoc.* 2013. V.8(12). P.2440-2448. doi: 10.1038/nprot.2013.154
34. Piovesan A., Pelleri M.C., Antonaros F., Strippoli P., Caracausi M., Vitale L. On the length, weight and GC content of the human genome // *BMC Res. Notes.* 2019. V.12(1):106. doi: 10.1186/s13104-019-4137-z
35. Psifidi A., Dovas C.I., Bramis G., Lazou T., Russel C.L., Arsenos G., Banos G. Comparison of eleven methods for genomic DNA extraction suitable for large-scale whole-genome genotyping and long-term DNA banking using blood samples // *PLoS One.* 2015. V.10(1):e0115960. doi: 10.1371/journal.pone.0115960
36. Rombach M., Kosse D., Faltin B., Wadle S., Roth G., Zengerle R., von Stetten F. Real-time stability testing of air-dried primers and fluorogenic hydrolysis probes stabilized by trehalose and xanthan // *Biotechniques.* 2014. V.57(3). P.151-155. doi: 10.2144/000114207
37. Schaudien D., Baumgärtner W., Herden C. High preservation of DNA standards diluted in 50% glycerol // *Diagn. Mol. Pathol.* 2007. V.16(3). P.153-157. doi: 10.1097/PDM.0b013e31803c558a
38. Shikama K. Effect of freezing and thawing on the stability of double helix of DNA // *Nature.* 1965. V.207(996). P.529-530. doi: 10.1038/207529a0
39. Shirkey B., McMaster N.J., Smith S.C., Wright D.J., Rodriguez H., Jaruga P., Birincioglu M., Helm R.F., Potts M. Genomic DNA of *Nostoc commune* (Cyanobacteria) becomes covalently modified during long-term (decades) desiccation but is protected from oxidative damage and degradation // *Nucleic Acids Res.* 2003. V.31(12). P.2995-3005. doi: 10.1093/nar/gkg404
40. Trapmann S., Catalani P., Hoorfar J., Prokisch J., van Iwaarden P., Schimmel H. Development of a novel approach for the production of dried genomic DNA for use as standards for qualitative PCR testing of food-borne pathogens // *Accreditation and Quality Assurance.* 2004. V.9. P.695-699. doi: 10.1007/s00769-004-0872-4
41. Wan E., Akana M., Pons J., Chen J., Musone S., Kwok P-Y., Liao W. Green technologies for room temperature nucleic acid storage // *Curr. Issues Mol. Biol.* 2010. V.12(3). P.135-142.
42. Washetine K., Heeke S., Ribeyre C., Bourreau C., Normand C., Blons H., Laurent-Puig P., Mulot C., Clermont D., David M., Clément B., Dagher G., Hofman P. DNAshell Protects DNA Stored at Room Temperature for Downstream Next-Generation Sequencing Studies // *Biopreserv. Biobank.* 2019. V.17(4). P.352-354. doi: 10.1089/bio.2018.0129
43. Washetine K., Kara-Borni M., Heeke S., Bonnetaud C., Félix J.M., Ribeyre L., Bence C., Ilié M., Bordone O., Pedro M., Maitre P., Tanga V., Gormally E., Mossuz P., Lorimier P., Marquette C.H., Mouroux J., Cohen C., Lassalle S., Long-Mira E., Clément B., Dagher G., Hofman V., Hofman P. Ensuring the Safety and Security of Frozen Lung Cancer Tissue Collections through the Encapsulation of Dried DNA // *Cancers (Basel).* 2018. V.10(6):195. doi: 10.3390/cancers10060195
44. Zagon J., Kurth S., Ehlers A., Linke B., Lampen A., Broll H. Preservation of primer and probes on "ready-to-use" 96-well microtiter plates: A step forward towards enhancing throughput and harmonization of real-time PCR applications in food and feed control // *Food Control.* 2012. V.25(2). P.709-716. doi: 10.1016/j.foodcont.2011.12.006

References

1. Bonnet J., Colotte M., Coudy D., Couallier V., Portier J., Morin B., Tuffet S. Chain and conformation stability of solid-state DNA: implications for room temperature storage // *Nucleic Acids Res.* 2010 Mar;38(5):1531-46. doi: 10.1093/nar/gkp1060
2. Bradbury J. Of tardigrades, trehalose, and tissue engineering // *Lancet.* 2001. V.358(9279). P.392. doi: 10.1016/S0140-6736(01)05595-7
3. Brundin M., Figdor D., Sundqvist G., Sjögren U. DNA binding to hydroxyapatite: a potential mechanism for preservation of microbial DNA // *J. Endod.* 2013. V.39(2). P.211-216. doi: 10.1016/j.joen.2012.09.013
4. Byrne J., Dahm R. Friedrich Miescher and the 150th anniversary of the discovery of DNA. *Biomics.* 2019. V.11(3). P. 249-258. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2019-23

5. Cataldo F. DNA degradation with ozone // *Int. J. Biol. Macromol.* 2006. V.38(3-5). P.248-254. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2006.02.029
6. Chen W.D., Kohll A.X., Nguyen B.H., Koch J., Heckel R., Stark W.J., Ceze L., Strauss K., Grass R.N. Combining Data Longevity with High Storage Capacity—Layer - by - Layer DNA Encapsulated in Magnetic Nanoparticles // *Advanced Functional Materials.* 2019. V.29(28). 1901672. doi.org/10.1002/adfm.201901672
7. Clement O., Whitney S., Muller-Cohn J., Muller R. Following nature's lead: generating compounds for stabilizing biomolecules // *Biopreserv. Biobank.* 2012. V.10(4). P.395-402. doi: 10.1089/bio.2012.0022
8. Clermont D., Santoni S., Saker S., Gomard M., Gardais E., Bizet C. Assessment of DNA encapsulation, a new room-temperature DNA storage method // *Biopreserv. Biobank.* 2014. V.12(3). P.176-183. doi: 10.1089/bio.2013.0082
9. Colotte M., Coudy D., Tuffet S., Bonnet J. Adverse effect of air exposure on the stability of DNA stored at room temperature // *Biopreserv. Biobank.* 2011. V.9(1). P.47-50. doi: 10.1089/bio.2010.0028
10. Davis D.L., O'Brien E.P., Bentzley C.M. Analysis of the degradation of oligonucleotide strands during the freezing/thawing processes using MALDI-MS // *Anal. Chem.* 2000. V.72(20). P.5092-5096. doi: 10.1021/ac000225s
11. Delhaes L., Filisetti D., Brenier-Pinchart M-P., Pelloux H., Yéra H., Dalle F., Sterkers Y., Varlet-Marie E., Touafek F., Cassaing S., Bastien P. Freezing and storage at -20 °C provides adequate preservation of *Toxoplasma gondii* DNA for retrospective molecular analysis // *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2014. V.80(3). P.197-199. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2014.08.007
12. Fripiat C., Noel F. Efficiency of a novel forensic room-temperature DNA storage medium // *Forensic Sci. Int. Genet.* 2014. V.9. P.81-84. doi: 10.1016/j.fsigen.2013.11.009
13. Fripiat C., Zorbo S., Leonard D., Marcotte A., Chaput M., Aelbrecht C., Noel F. Evaluation of novel forensic DNA storage methodologies // *Forensic Sci. Int. Genet.* 2011. V.5(5). P.386-392. doi: 10.1016/j.fsigen.2010.08.007
14. Garafutdinov R.R., Galimova A.A., Sakhabutdinova A.R., Chemeris A.V. PCR-based evaluation of sequence specificity of DNA fragmentation by ultrasound. *Molecular Biology.* 2016. V.50(2) P 236-241. DOI: 10.1134/S0026893316020059
15. Grass R.N., Heckel R., Puddu M., Paunescu D., Stark W.J. Robust chemical preservation of digital information on DNA in silica with error-correcting codes // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2015. V.54(8). P.2552-2555. doi: 10.1002/anie.20141137
16. Howlett S.E., Castillo H.S., Gioeni L.J., Robertson J.M., Donfack J. Evaluation of DNAsable for DNA storage at ambient temperature // *Forensic Sci. Int. Genet.* 2014. V.8(1). P.170-178. doi: 10.1016/j.fsigen.2013.09.003
17. Jacobs D., Neilan B.A. Long-term preservation of DNA in agarose gels using 70% ethanol // *Biotechniques.* 1995. V.19(6). P.892-894.
18. Ivanova N.V., Kuzmina M.L. Protocols for dry DNA storage and shipment at room temperature // *Mol. Ecol. Resour.* 2013. V.13(5). P.890-898. doi: 10.1111/1755-0998.12134
19. Kohll A.X., Antkowiak P.L., Chen W.D., Nguyen B.H., Stark W.J., Ceze L., Strauss K., Grass R.N. Stabilizing synthetic DNA for long-term data storage with earth alkaline salts // *Chem. Commun. (Camb.).* 2020. V.56(25). P.3613-3616. doi: 10.1039/d0cc00222d
20. Laniel M.A., el-Amine M., Boire G., Ménard H.A. Southern blotting of long-term preserved DNA // *Biotechniques.* 1997. V.22(4). P.595-596. doi: 10.2144/97224bm02
21. Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA // *Nature.* 1993. V.362(6422). P.709-715. doi: 10.1038/362709a0
22. Lindahl T. The Croonian Lecture, 1996: endogenous damage to DNA // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1996. V.351(1347). P.1529-1538. doi: 10.1098/rstb.1996.0139
23. Liu X., Li Q., Wang X., Zhou X., He X., Liao Q., Zhu F., Cheng L., Zhang Y. Evaluation of DNA/RNAs shells for room temperature nucleic acids storage // *Biopreserv. Biobank.* 2015. V.13(1). P.49-55. doi: 10.1089/bio.2014.0060
24. Lyscov V.N., Moshkovsky Y. DNA cryolysis // *Biochim. Biophys. Acta.* 1969. V.190(1). P.101-110. doi: 10.1016/0005-2787(69)90158-0
25. Matniyazov R.T., Chemeris D.A., Kuluev A.R., Zubov V.V., Chemeris A.V. The diversity of approaches for randomly fragmented DNA. *Biomics.* 2014. V.6(3). P.155-166. (In Russian)
26. McDevitt S.L., Hogan M.E., Pappas D.J., Wong L.Y., Noble J.A. DNA storage under high temperature conditions does not affect performance in human leukocyte antigen genotyping via next-generation sequencing (DNA integrity maintained in extreme conditions) // *Biopreserv. Biobank.* 2014. V.12(6). P.402-408. doi: 10.1089/bio.2014.0036
27. Mínguez-Toral M., Cuevas-Zuviría B., Garrido-Arandia M., Pacios L.F. A computational structural study on the DNA-protecting role of the tardigrade-unique Dsup protein // *Sci Rep.* 2020. V.10(1):13424. doi: 10.1038/s41598-020-70431-1
28. Montgomery M.C., Berka J., Weimer E.T. Suitability of dried DNA for long-range PCR

- amplification and HLA typing by next-generation sequencing // *Hum. Immunol.* 2019. V.80(2). P.135-139. doi: 10.1016/j.humimm.2018.12.002
29. Muller R., Betsou F., Barnes M.G., Harding K., Bonnet J., Kofanova O., Crowe J.H., International Society for Biological and Environmental Repositories (ISBER) Biospecimen Science Working Group. Preservation of Biospecimens at Ambient Temperature: Special Focus on Nucleic Acids and Opportunities for the Biobanking Community // *Biopreserv. Biobank.* 2016. V.14(2). P.89-98. doi: 10.1089/bio.2015.0022
30. Palmer R. Companies hope to bring DNA storage in from the cold // *Nature Medicine.* 2010. V.16(10). P.1056-1057.
31. Paunescu D., Mora C.A., Puddu M., Krumeich F., Grass R.N. DNA protection against ultraviolet irradiation by encapsulation in a multilayered SiO₂/TiO₂ assembly // *J. Mater. Chem. B.* 2014. V.2(48). P.8504-8509. doi: 10.1039/c4tb01552e
32. Paunescu D., Puddu M., Soellner J.O.B., Stoessel P.R., Grass R.N. Reversible DNA encapsulation in silica to produce ROS-resistant and heat-resistant synthetic DNA 'fossils' // *Nat. Protoc.* 2013. V.8(12). P.2440-2448. doi: 10.1038/nprot.2013.154
33. Piovesan A., Pelleri M.C., Antonaros F., Strippoli P., Caracausi M., Vitale L. On the length, weight and GC content of the human genome // *BMC Res. Notes.* 2019. V.12(1):106. doi: 10.1186/s13104-019-4137-z
34. Psifidi A., Dovas C.I., Bramis G., Lazou T., Russel C.L., Arsenos G., Banos G. Comparison of eleven methods for genomic DNA extraction suitable for large-scale whole-genome genotyping and long-term DNA banking using blood samples // *PLoS One.* 2015. V.10(1):e0115960. doi: 10.1371/journal.pone.0115960
35. Rombach M., Kosse D., Faltin B., Wadle S., Roth G., Zengerle R., von Stetten F. Real-time stability testing of air-dried primers and fluorogenic hydrolysis probes stabilized by trehalose and xanthan // *Biotechniques.* 2014. V.57(3). P.151-155. doi: 10.2144/000114207
36. Sakhabutdinova A.R., Mikhailenko K.I., Garafutdinov R.R., Kiryanova O.Yu., Sagitova M.A., Sagitov A.M., Chemeris A.V. Non-biological application of DNA molecules. *Biomics.* 2019. V.11(3). P. 344-377. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2019-28 (In Russian)
37. Schaudien D., Baumgärtner W., Herden C. High preservation of DNA standards diluted in 50% glycerol // *Diagn. Mol. Pathol.* 2007. V.16(3). P.153-157. doi: 10.1097/PDM.0b013e31803c558a
38. Shikama K. Effect of freezing and thawing on the stability of double helix of DNA // *Nature.* 1965. V.207(996). P.529-530. doi: 10.1038/207529a0
39. Shirkey B., McMaster N.J., Smith S.C., Wright D.J., Rodriguez H., Jaruga P., Birincioglu M., Helm R.F., Potts M. Genomic DNA of *Nostoc commune* (Cyanobacteria) becomes covalently modified during long-term (decades) desiccation but is protected from oxidative damage and degradation // *Nucleic Acids Res.* 2003. V.31(12). P.2995-3005. doi: 10.1093/nar/gkg404
40. Trapmann S., Catalani P., Hoorfar J., Prokisch J., van Iwaarden P., Schimmel H. Development of a novel approach for the production of dried genomic DNA for use as standards for qualitative PCR testing of food-borne pathogens // *Accreditation and Quality Assurance.* 2004. V.9. P.695-699. doi: 10.1007/s00769-004-0872-4
41. Wan E., Akana M., Pons J., Chen J., Musone S., Kwok P-Y., Liao W. Green technologies for room temperature nucleic acid storage // *Curr. Issues Mol. Biol.* 2010. V.12(3). P.135-142.
42. Washetine K., Heeke S., Ribeyre C., Bourreau C., Normand C., Blons H., Laurent-Puig P., Mulot C., Clermont D., David M., Clément B., Dagher G., Hofman P. DNAshell Protects DNA Stored at Room Temperature for Downstream Next-Generation Sequencing Studies // *Biopreserv. Biobank.* 2019. V.17(4). P.352-354. doi: 10.1089/bio.2018.0129
43. Washetine K., Kara-Borni M., Heeke S., Bonnetaud C., Félix J.M., Ribeyre L., Bence C., Ilié M., Bordone O., Pedro M., Maitre P., Tanga V., Gormally E., Mossuz P., Lorimier P., Marquette C.H., Mouroux J., Cohen C., Lassalle S., Long-Mira E., Clément B., Dagher G., Hofman V., Hofman P. Ensuring the Safety and Security of Frozen Lung Cancer Tissue Collections through the Encapsulation of Dried DNA // *Cancers (Basel).* 2018. V.10(6):195. doi: 10.3390/cancers10060195
44. Zagon J., Kurth S., Ehlers A., Linke B., Lampen A., Broll H. Preservation of primer and probes on "ready-to-use" 96-well microtiter plates: A step forward towards enhancing throughput and harmonization of real-time PCR applications in food and feed control // *Food Control.* 2012. V.25(2). P.709-716. doi: 10.1016/j.foodcont.2011.12.006