



ВЛИЯНИЕ ДЛИНЫ МОЛЕКУЛ И ПРИРОДЫ СРЕДЫ НА ФРАГМЕНТАЦИЮ ДНК УЛЬТРАЗВУКОМ

Гарафутдинов Р.Р., Галимова А.А., 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
450054, пр. Октября, 71, Уфа, Россия
e-mail: garafutdinovr@mail.ru

Резюме

Ультразвуковая фрагментация является наиболее оптимальным способом искусственного разрушения цепей ДНК, не требующим дополнительных реагентов и позволяющим получить "чистый" препарат для непосредственного дальнейшего применения. Однако, несмотря на достаточно активное использование ультразвуковой фрагментации ДНК в научных исследованиях, слабо изученным остается ряд вопросов, связанных с применимостью механически фрагментированной ДНК для проведения стандартных молекулярно-биологических операций. В работе приведены данные о влиянии размера молекул ДНК (на модели ДНК-ампликонов) и состава водных растворов на эффективность их разрушения под действием ультразвука. Показано, что скорость фрагментации ДНК положительно коррелирует с увеличением длины молекул. В растворах с высокой ионной силой скорость разрушения резко увеличивается. Присутствие органических растворителей, не влияющих на гибридизацию, несколько снижает скорость ультразвукового разрушения. С увеличением длины молекул ДНК влияние денатурирующих агентов изменяется и приводит к повышению скорости фрагментации. Молекулы дцДНК размером менее одной персистентной длины (около 150 п.о.) практически не фрагментируются.

Ключевые слова: ДНК, ампликоны, ультразвук, механическая фрагментация, персистентная длина

Цитирование: Гарафутдинов Р.Р., Галимова А.А., Сахабутдинова А.Р., Чемерис А.В. Влияние длины молекул и природы среды на фрагментацию ДНК ультразвуком // *Biomics*. 2023. Т.15(2). С. 87-95. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2023-12

© Авторы

THE INFLUENCE OF MOLECULES LENGTH AND THE ENVIRONMENT ON DNA FRAGMENTATION BY ULTRASOUND

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

Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences,
71 Pr. Oktyabrya, 450054, Ufa, Russia, E-mail: garafutdinovr@mail.ru

Resume

Fragmentation of DNA by ultrasound is the most optimal method of artificial degradation of DNA molecules. It requires no reagents and makes it possible to obtain "pure" DNA samples for further use. However, despite an active usage of ultrasonic fragmentation in studies, a number of issues related to the applicability of mechanically degraded DNA for standard molecular biological operations remain poorly studied. This report

presents data on the effect of the size of DNA molecules (on DNA amplicons) and the composition of aqueous solutions on the efficiency of DNA destruction by ultrasound. It has been shown that the rate of DNA fragmentation positively correlates with an increase in the length of molecules. In solutions with high ionic strength, the rate of fragmentation increases dramatically. The presence of organic solvents that do not affect hybridization slightly reduces the rate of ultrasonic destruction. With an increase in the length of DNA molecules, the influence of denaturing agents changes and leads to an increase in the rate of fragmentation. dsDNA molecules smaller than one persistent length (about 150 bp) are not fragmented.

Keywords: DNA, amplicons, ultrasound, mechanical fragmentation, persistent length

Citation: Garafutdinov R.R., Galimova A.A., Sakhabutdinova A.R., Chemeris A.V. The influence of molecules length and the environment on DNA fragmentation by ultrasound. *Biomics*. 2023. V.15(2). P.87-95. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2023-12 (In Russian)

© The Authors

Введение

Фрагментация ДНК в водных растворах под действием ультразвука находит достаточно широкое применение в современных методах исследования генома [Mann, Krull, 2004; Ansorge, 2009]. Ранее считалось, что ультразвуковое разрушение ДНК носит случайный характер [Elsner, Lindblad, 1989], однако по мере накопления экспериментальных данных произошли изменения в понимании происходящих событий [Taun et al., 2010; Chen et al., 2013; Poptsova et al., 2014]. После определения конформационных параметров цепей ДНК сформировались представления о так называемых контекстнозависимых динамических свойствах этих молекул [Packer et al. 2010]. Это позволило получить первые экспериментальные доказательства сайт-специфического действия ультразвука на ДНК. Так, было показано, что разрывы чаще всего происходят в участках, содержащих динуклеотиды 5'-CG-3', преимущественно между цитозином и гуанозином [Гроховский (Grokhovsky), 2006]. Позднее были выявлены некоторые особенности ультразвукового расщепления ДНК в различных условиях [Гроховский и др. (Grokhovsky et al.), 2008; 2013; Нечипуренко и др. (Nechiperenko et al.), 2009; Grokhovsky et al., 2011].

Под действием ультразвука в ДНК возникают одно- и двуниевые разрывы, при этом размер образующихся фрагментов зависит от интенсивности и продолжительности его воздействия [Elsner, Lindblad, 1989]. Уже через 1-2 минуты после начала ультразвукового облучения ДНК разрушается на фрагменты размером менее 2000 п.н., а затем скорость расщепления резко падает. Длительное облучение (30-40 мин) приводит, как правило, к фрагментам размером 100-1500 п.н. с максимумом около 500 п.н. [Elsner, Lindblad, 1989, Laguinho et al., 2010]. Наличие нижнего порога фрагментации обусловлено, видимо, относительной жесткостью молекул ДНК и зависит от ее персистентной длины. Hagerman показал, что персистентная длина нативной

ДНК составляет около 50 нм (соответствует примерно 160 нуклеотидам) и изменяется в зависимости от условий среды (рН, ионная сила и др.) [Hagerman, 1981].

Для оценки сиквенс-специфичности ультразвуковой фрагментации ДНК было предложено использовать метод количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР). В одной из наших работ [Гарафутдинов и др. (Garafutdinov et al.), 2016] было показано, что с наибольшей скоростью расщепляются участки с равномерным распределением и средней плотностью динуклеотидов 5'-CG-3' (в среднем один CpG на 14-15 нуклеотидов цепи). При этом количество ДНК-мишеней, доступных для амплификации, в препарате, полученном длительной фрагментацией тотальной ДНК, уменьшается как минимум на порядок относительно рассчитанного по концентрации. Оказалось, что метилирование цитозина дополнительно повышает частоту расщепления дцДНК по сайтам 5'-CG-3' [Garafutdinov et al., 2019]. Наибольшее различие в количестве амплифицируемых ДНК-мишеней между метилированной и условно неметилированной ДНК наблюдается после кратковременного (до 5 мин) облучения ультразвуком; по данным гель-электрофоретического анализа максимальное различие в степени фрагментации ДНК наблюдается при 15-20 мин облучении.

Несмотря на достаточно активное использование ультразвуковой фрагментации ДНК в научных исследованиях, слабо изученным остается ряд вопросов, связанных с применимостью механически фрагментированной ДНК для проведения стандартных молекулярно-биологических операций. Так, лишь в одной давней работе представлены результаты исследования влияния фрагментации ДНК на эффективность ПЦР [Golenberg et al., 1996]. Позднее были предложены подходы к обнаружению специфических мишеней в ДНК-препаратах, подвергшихся целенаправленному

воздействию ультразвука на этапе пробоподготовки [Машков и др. (Mashkov et al.), 2016; 2016a; Сахабутдинова и др. (Sakhabutdinova et al.), 2017]. Значительный интерес представляет также изучение объектов биологического происхождения, которые находились под воздействием разрушающих факторов окружающей среды и содержат ДНК, малопригодную для анализа [Гарафутдинов и др. (Garafutdinov et al.), 2015a]. Вследствие фрагментации или из-за наличия безазотистых участков, сшивок и иных химических модификаций, анализ подобной ДНК требует использования нетривиальных методических приемов [Чемерис и др. (Chemeris et al.), 2011; Бикбулатова и др. (Bikbulatova et al.), 2012; Гарафутдинов и др. (Garafutdinov et al.), 2015; Garafutdinov et al., 2017].

Цель данной работы заключалась в изучении влияния размера молекул и состава водных растворов на эффективность разрушения ДНК под действием ультразвука.

Материалы и методы

В работе использованы реактивы: 5-(этиллио)-1*H*-тетразол, амидофосфиты (dA-CE, dC-CE, dG-CE, dT-CE), носители для синтеза олигонуклеотидов (dA-CPG, dC-CPG, dG-CPG, dT-CPG) (Glen Research); абсолютные ацетонитрил и

тетрагидрофуран квалификации «для синтеза ДНК» (Panreac); акриламид, N,N'-метиленабисакриламид, Трис, персульфат аммония, динатриевая соль N,N,N',N'-этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (AppliChem); агароза (Amresco); Taq ДНК-полимераза (Thermo Fisher Scientific), дезоксинуклеозидтрифосфаты (dNTPs) (СибЭнзим), SYBR Green I (Люмипроб); ДНК фага Лямбда (Thermo Fisher Scientific). Для приготовления всех растворов использовали воду высшей категории качества > 18 МОм (Millipore).

Олигонуклеотидные праймеры подбирали на основе последовательностей нуклеотидов, депонированных в GenBank [<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>] с использованием online-утилиты OligoAnalyzer [<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>]. Синтез праймеров осуществлен на автоматическом ДНК-синтезаторе ASM-800 (Биоссет) амидофосфитным способом, их очистку проводили методом гель-электрофореза в 15%-ном ПААГ. Концентрацию всех нуклеиновых кислот определяли по оптической плотности водного раствора при 260 нм на спектрофотометре BioSpec-Mini (Shimadzu). Последовательности использованных в работе праймеров представлены в таблице 1.

Таблица 1. Использованные в работе олигонуклеотидные праймеры
Table 1. Oligonucleotide primers used

Праймер	Последовательность, 5'→3'	Длина праймера, нуклеотиды
F1	cgtgtgaaacataacgcaggagat	25
F2	ccgttgattggggcttaaggc	22
R166	ggaacacgactctgaggacagc	22
R621	cctcgattgctaccgtcgaactg	23
R352	ggtttagtgttcccagtgactcgc	25
R1029	gtttccctgacttcgtcctgg	22

В качестве ДНК-матрицы для наработки ампликонов использована тотальная ДНК богомола обыкновенного (*Mantis religiosa*), которую выделяли из мышечной ткани этого насекомого с помощью коммерческого набора «ДНК-Экстран-2» (Синтол) по протоколу производителя. Также использовался коммерческий препарат ДНК фага Лямбда для оптимизации условий ультразвуковой фрагментации.

Наработку ДНК-ампликонов проводили в ДНК-амплификаторе T100 (Bio-Rad Laboratories). Реакционные смеси имели объем 30 мкл и содержали

30.0 нг ДНК богомола обыкновенного (10⁴ копий генома), 3.0 мкл каждого из праймеров с концентрацией 1.0 ОЕ/мл, 5 ед. акт. Taq ДНК-полимеразы, 3.0 мкл смеси dNTP с концентрацией 2.5 мМ, 3 мкл буфера для Taq ДНК-полимеразы: 68 мМ Трис-НСl (рН 8.8), 2.0 мМ MgCl₂, 18 мМ (NH₄)₂SO₄, 0.01% Твин-20. ПЦР проводили по стандартной программе: начальная денатурация при 94°C (3 мин), 30 циклов – денатурация при 94°C (20 с), отжиг при 59°C (30 с), элонгация при 72°C (20 с) и конечная элонгация при 72°C (2 мин).

Фрагментацию ДНК и ДНК-ампликонов проводили в приборе BioRuptor (Diagenode), облучая водные растворы в 0,6 мл тонкостенных полипропиленовых пробирках типа erpendorf. Пробирки с приготовленным раствором ДНК помещали в тefлоновое кольцо с центральным отверстием и с радиальными отверстиями для пробирок. Кольцо вставляли в моторизованную крышку, пробирки при этом оказываются погруженными в ультразвуковую ванну с водой и мелкоизмельченным льдом. Все образцы для ультразвукового дробления ДНК были представлены трехкратными повторами, которые в конце обработки ультразвуком объединяли. При оптимизации условий фрагментации ультразвуком облучали растворы 10 мкг тотальной ДНК фага Лямбда в 50 мкл воды при трех возможных режимах воздействия: слабого ("low", частота ультразвука 20 кГц), среднего ("medium", 40 кГц) и сильного воздействия ("high", 60 кГц) с 0.5-мин интервалами при общей продолжительности от 10 до 90 мин. В экспериментах по ультразвуковому дроблению ампликонов облучали растворы ДНК объемом от 5 до 50 мкл в режиме "high". Для оценки влияния условий среды на характер ультразвукового дробления ампликонов фрагментацию проводили в растворах 2 М хлорида натрия, 50%-ного этанола и 30%-ного формамида объемом 25 мкл. Результаты фрагментации визуализировали методом гель-электрофореза в 1%-ном агарозном или 10%-ном полиакриламидном гелях, с окрашиванием гелей бромистым этидием и их визуализацией в приборе Gel Camera System (UVP Inc.). Оцифровку результатов фрагментации осуществляли с использованием программы TotalLab 1.10. (Phoretix).

Результаты и обсуждение

Фрагментация ДНК ультразвуком в некотором приближении моделирует процессы механической деградации нуклеиновых кислот, происходящие в естественных условиях, следовательно, закономерности ее протекания могут быть приняты во внимание при работе, например, с древней ДНК. В данной работе фрагментацию ДНК осуществляли в приборе BioRuptor компании Diagenode, предназначенном для приготовления ДНК-библиотек для секвенирования методами NGS. Разрушение ДНК в нем осуществляется непосредственно в пробирках типа erpendorf при трех возможных режимах воздействия: слабого (low), среднего (medium) и сильного (high). Ультразвуковой фрагментации подвергали тотальную ДНК и ДНК-ампликоны разной длины, анализ фрагментации проводили с помощью гель-электрофореза с последующей денситометрией зон геля.

Сначала были проведены эксперименты, в которых оптимизировали технические параметры ультразвуковой обработки ДНК. Для подбора условий фрагментации в качестве модельного объекта взяли ДНК фага Лямбда. Ультразвуковая обработка данной ДНК в режиме "high" в 50 мкл раствора показала закономерное повышение степени фрагментации с увеличением длительности воздействия. При двухминутном воздействии ДНК практически не разрушалась, а с увеличением продолжительности до 38 минут диапазон размеров фрагментов ДНК сужался и имел максимумы в области 300 п.о. после 10-минутного и в области 150-300 п.о. после 38-минутного облучения (рис. 1). Для режимов "low" и "medium" также наблюдалось разрушение, но оно происходило с меньшей скоростью, а на электрофореграмме обнаруживался более длинный шмер фрагментов с менее выраженным максимумом (данные не приведены).

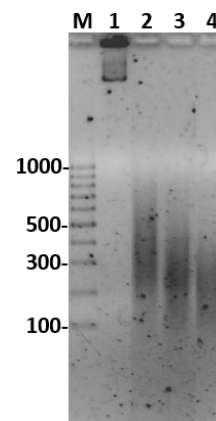


Рис. 1. Фрагментация ДНК фага лямбда ультразвуком (режим "high", объем раствора 50 мкл). Дорожки: 1 – 2 мин воздействия, 2 – 10 мин, 3 – 26 мин, 4 – 38 мин, М – маркер.

Fig. 1. Fragmentation of lambda phage DNA by ultrasound ("high" mode, 50 µl solution volume). Tracks: 1 – 2 min exposure, 2 – 10 min, 3 – 26 min, 4 – 38 min, M – marker.

Поскольку электрофорез разрушенной ультразвуком тотальной ДНК относительно малоинформативен, для исследования характера фрагментации ДНК далее было использовано дробление ампликонов. Их размер и нуклеотидный состав заранее известны, что дает определенные преимущества при интерпретации результатов. Использование ДНК-ампликонов с дальнейшей экстраполяцией полученных данных на естественное поведение молекулы ДНК, на наш взгляд, является возможным в силу того, что при воздействии внешней силы поведение как молекул длинноцепочечных ДНК,

так и ДНК-ампликонов зависит от локальных конформационно-динамических свойств, определяющихся последовательностью нуклеотидов. ДНК-ампликоны были получены с помощью ПЦР-

амплификации фрагмента гена 28S рРНК богомола обыкновенного, к которому были подобраны соответствующие видоспецифичные праймеры (рис. 2).

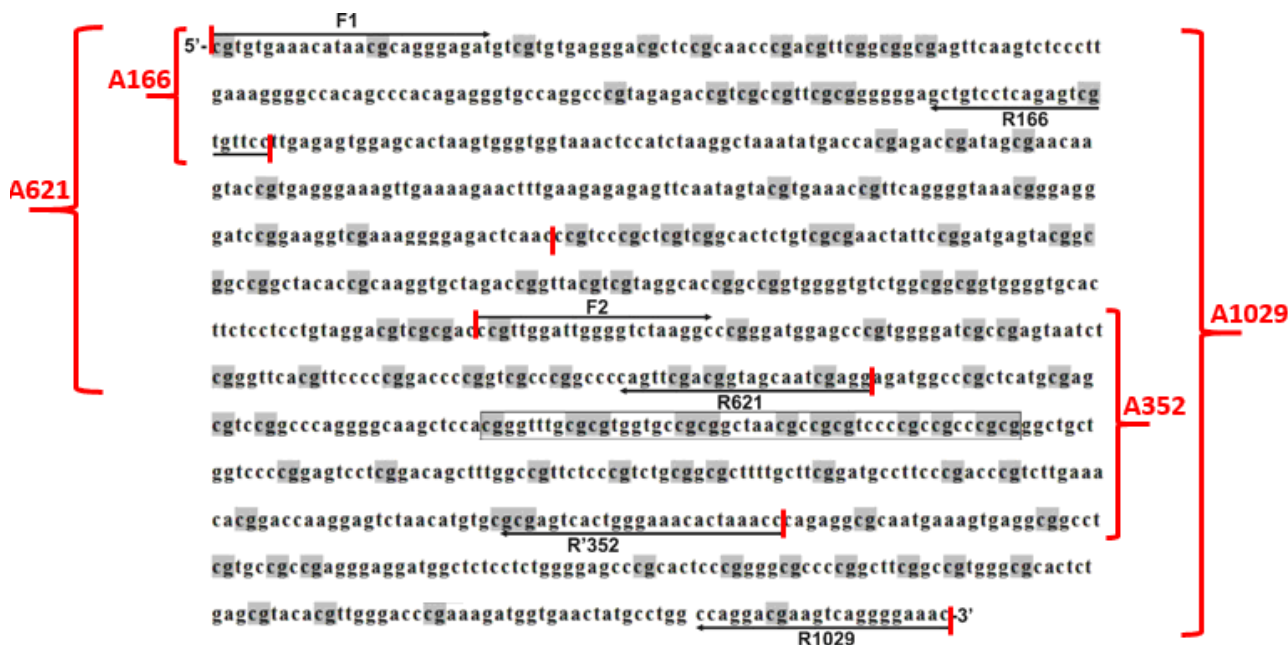


Рис. 2. Нуклеотидная последовательность, использованная для получения ДНК-ампликонов (указано расположение праймеров).

Fig. 2. The nucleotide sequence used to obtain DNA amplicons (the location of primers is indicated).

Обратные праймеры R166, R621 и R1029 дали в ходе ПЦР с прямым праймером F1 продукты длиной 166 (ампликон A166), 621 (A621) и 1029 (A1029) п.о., соответственно. Обратный праймер R352 подобран к прямому праймеру F2 и образует с ним продукт длиной 352 п.о. (A352). Ампликоны конструировали с учетом значения персистентности длины ДНК (~50 нм): размер A166 соответствует примерно одной, A352 - двум, A621 - четырем, а A1029 - семи персистентным длинам ДНК. Данные ампликоны характеризуются высоким содержанием динуклеотидов 5'-CG-3'. Поскольку разрывы цепей ДНК чаще происходят по 5'-CG-3'-сайтам [8, 15], мы предположили, что ампликоны будут подвергаться фрагментации достаточно эффективно. Данные четыре ампликона были наработаны в препаративных количествах, очищены от компонентов ПЦР-реакционной смеси и затем подвергнуты воздействию ультразвука.

Сначала подбирали рабочие параметры ультразвуковой обработки ДНК-ампликонов, которые обеспечивали бы возможность изучения разрушения ДНК в выбранном диапазоне длин ДНК, условий среды и их нуклеотидного состава. В качестве

реперного был взят ампликон средней длины - A621. Для определения достаточного для разрушения объема водного раствора ДНК ультразвуковую обработку проводили в 5, 15, 25 и 50 мкл в течение 10, 20 и 30 минут. Практически полному разрушению подверглась ДНК только в растворах объемом 25 и 50 мкл после 20-минутной обработки (данные не приведены). При меньшем объеме скорость фрагментации падала, что объясняется, скорее всего, тем, что в малых объемах образование кавитационных пузырьков, вызывающих дробление ДНК, затруднено. Указанные параметры были найдены для режима "high"; в режимах "low" и "medium" ампликон A621 не разрушался. В связи с этим дальнейшие эксперименты по ультразвуковой фрагментации ампликонов вели только для режима "high", использовали для ультразвуковой фрагментации 25 мкл раствора ДНК (и тотальной, и ампликонов) при продолжительности до 45 минут. После ультразвукового воздействия кинетику фрагментации ампликонов визуализировали посредством горизонтального электрофореза в гелях с последующей денситометрией (рис. 3).

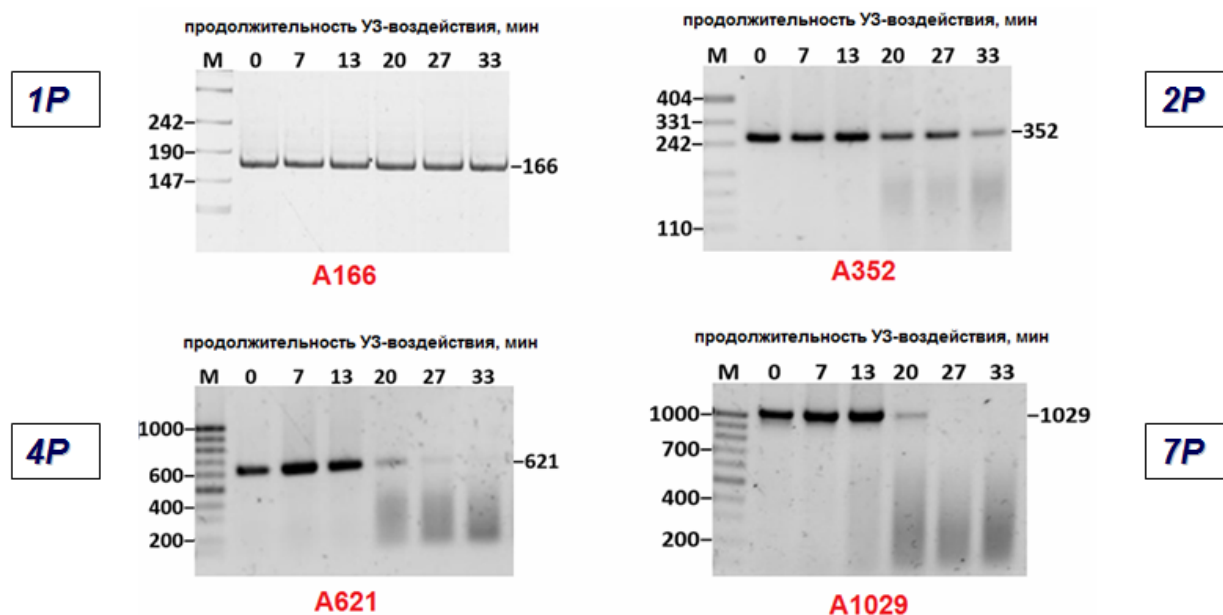


Рис. 3. Скорость фрагментации ампликонов: A166, A352, A621, A1029.
 Fig. 3. The rate of fragmentation of amplicons: A166, A352, A621, A1029.

Для этого в зонах геля, соответствующих каждой из ячеек, были выделены по две области: область с цельными ампликонами – четко выраженная полоса, соответствующая длине ампликона, и область с фрагментированными ампликонами – облако фрагментов ниже основной полосы. Денситометрия зон геля показала соотношение цельных и фрагментированных ампликонов для каждой ячейки. При этом 100% количеством ампликонов выступило их суммарное количество.

Оказалось, что A166 не подвергается ультразвуковой фрагментации даже спустя 30 минут облучения (рис. 3А), а для A352, A621 и A1029 ощутимое разрушение наблюдалось после 20-минутной обработки (рис. 3Б-3Г). Эффективность фрагментации увеличивалась с ростом размера молекул. Так, для A352 обнаруживалась лишь частичная фрагментация: даже после 30 минут облучения сохранялись целноразмерные молекулы (рис. 3Б). В случае A621 и A1029, через 0,5 ч воздействия наблюдалась полная фрагментация (рис. 3В, 3Г). Показательно, что ни в одном из случаев минимальный размер образующихся фрагментов (нижняя граница шмера) не опускался ниже 100 п.о. Таким образом, молекулы ДНК размером не более одной персистентной длины в чистой воде, т.е. в В-форме, не подвергаются ультразвуковой фрагментации.

Однако на форму двойной спирали существенное влияние могут оказывать компоненты раствора. В связи с этим было изучено поведение

ампликонов при их облучении ультразвуком в растворах 2 М хлорида натрия, 50%-ного этанола и 30%-ного формамида. Ампликон A166 вновь не подвергался фрагментации даже спустя полчаса облучения ни в одном из указанных растворов; лишь в растворе 2 М NaCl наблюдалось появление незначительного количества продуктов фрагментации после окончания воздействия (рис. 4).

Хлорид натрия существенно ускорял разрушение A352, A621 и A1029, которое начиналось практически сразу после начала ультразвуковой обработки, что связано, вероятно, с изменением конформации молекул ДНК. Формамид ускорял разрушение длинных ампликонов (A621 и A1029) и замедлял разрушение короткого - A352. Формамид увеличивает вязкость среды, что напрямую влияет, во-первых, на условия образования кавитационных пузырьков (скорость микропотоков, температура водного раствора), и во-вторых, на конформационные параметры самих молекул. Снижение скорости расщепления короткого ампликона A352, возможно, объясняется увеличением гибкости, лабильности короткой молекулы в более вязкой среде; также не исключено частичное расплетение двойной спирали при более высокой температуре, которая достигается при образовании кавитационных пузырей в более вязкой, по сравнению с водной, среде. Наличие этанола повышало стойкость к разрушению для всех ампликонов, вероятно, за счет удаления гидратной оболочки и, как следствие, изменения конформации молекул ДНК.

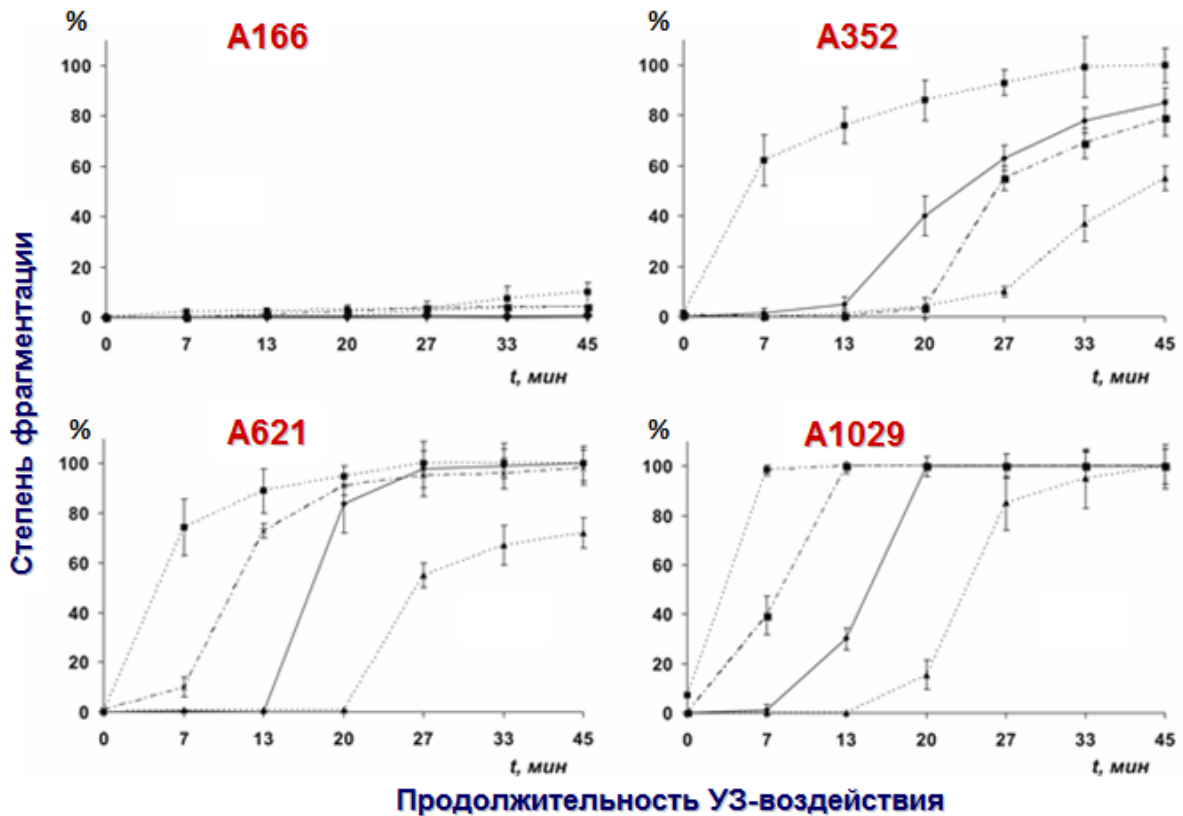


Рис. 4. Влияние условий среды на скорость УЗ-дробления ампликонов: сплошная линия - контроль (водный раствор), пунктирная - 2 M NaCl, точечная - 50%-ный водный этанол, пунктир-точка - 30%-ный водный формамид.

Fig. 4. Influence of environmental conditions on the rate of amplicon crushing: solid line - control (aqueous solution), dotted line - 2 M NaCl, dotted line - 50% aqueous ethanol, dotted line - 30% aqueous formamide.

Таким образом, изучены некоторые закономерности разрушения относительно коротких (до примерно 1000 п.о.) молекул ДНК на модели ДНК-ампликонов под действием ультразвука. Показано, что скорость их фрагментации при облучении ультразвуком высокой интенсивности (60 кГц) положительно коррелирует с увеличением длины молекул. Обнаружено, что в растворах с высокой ионной силой скорость фрагментации ДНК резко увеличивается. Присутствие органических растворителей, не влияющих на гибридизацию цепей ДНК, несколько снижает скорость ультразвукового разрушения (продемонстрировано на примере этанола). С увеличением длины молекул ДНК влияние денатурирующих агентов изменяется и приводит к повышению скорости фрагментации (продемонстрировано на примере формамида). Молекулы дцДНК размером менее одной персистентной длины (около 150 п.о.) практически не фрагментируются.

Благодарности

Исследование выполнено в рамках государственного задания (№ АААА-А21-121011990119-1).

Литература:

1. Бикбулатова С.М., Чемерис Д.А., Никоноров Ю.М., Машков О.И., Гарафутдинов Р.Р., Чемерис А.В., Вахитов В.А. Способы детекции результатов полимеразной цепной реакции в режиме реального времени // Вестн. Башк. ун-та. 2012. Т. 17(1). С. 59-67.
2. Гарафутдинов Р.Р., Галимова А.А., Сахабутдинова А.Р., Вахитов В.А., Чемерис А.В. ПЦР-амплификация ДНК с помощью праймеров «встык» // Молек. биол. 2015. Т. 49(4). С. 628-637. doi: 10.7868/S0026898415040059.
3. Гарафутдинов Р.Р., Галимова А.А., Сахабутдинова А.Р., Чемерис А.В. ПЦР-анализ специфичной к последовательности ультразвуковой фрагментации ДНК // Молек. биол. 2016. Т. 50(2). С. 272-278. doi: 10.7868/S0026898416020051

4. Гарафутдинов Р.Р., Нагаев Н.Р., Сахабутдинова А.Р., Чемерис А.В. Аутентичность, сохранность и доступность древней ДНК // *Вестн. Башк. ун-та*. 2015а. Т. 20. С. 432-439.
5. Гроховский С.Л. Специфичность расщепления ДНК ультразвуком // *Молек. биол.* 2006. Т. 40. С. 317-325.
6. Гроховский С.Л., Ильичева И.А., Нечипуренко Д.Ю., Панченко Л.А., Полозов Р.В., Нечипуренко Ю.Д. Локальные неоднородности структуры и динамики двуспиральной ДНК: исследование при помощи ультразвука // *Биофизика*. 2008. Т. 53. С. 417-425.
7. Гроховский С.Л., Ильичева И.А., Панченко Л.А., Головкин М.В., Нечипуренко Д.Ю., Полозов Р.В., Нечипуренко Ю.Д. Ультразвуковое расщепление ДНК в комплексах с катионами Ag(I), Cu(II), Hg(II) // *Биофизика*. 2013. Т. 58. С. 36-46.
8. Машков О.И., Поскряков А.В., Николенко А.Г., Гарафутдинов Р.Р. Определение ботанического происхождения мёда с помощью ПЦР // *Пчеловодство*. 2016. №2. С. 56-58.
9. Машков О.И., Поскряков А.В., Николенко А.Г., Гарафутдинов Р.Р. Установление ботанического происхождения мёда с помощью полимеразной цепной реакции // *Биомика*. 2016а. Т. 8(2). С. 154-160.
10. Нечипуренко Ю.Д., Головкин М.В., Нечипуренко Д.Ю., Ильичева И.А., Панченко Л.А., Полозов Р.В., Гроховский С.Л. Характерные особенности расщепления ДНК ультразвуком // *Ж. Структ. Хим.* 2009. Т. 50. С. 1045-1052.
11. Сахабутдинова А.Р., Максимова М.А., Гарафутдинов Р.Р. Получение кольцевых одноцепочечных ДНК-матриц с помощью T4 РНК лигазы для амплификации по типу катящегося кольца // *Молек. биол.* 2017. Т. 51(4). С. 724-733. doi: 10.7868/S0026898417040164
12. Чемерис Д.А., Магданов Э.Г., Машков О.И., Гарафутдинов Р.Р., Чемерис А.В. ПЦР с отложенным (горячим или задержанным) стартом // *Биомика*. 2011. Т. 2(1). С. 1-8.
13. Ansorge W.J. Next-generation DNA sequencing techniques // *Nature Biotechnol.* 2009. V. 25. P. 195-203. doi: 10.1016/j.nbt.2008.12.009
14. Chen Y.-C., Liu T., Yu C.-H., Chiang T.-Y., Hwang C.-C. Effects of GC bias in next-generation-sequencing data on de novo genome assembly // *PLoS ONE*. 2013. V. 8. e62856. doi: 10.1371/journal.pone.0062856
15. Elsner H.I., Lindblad E.B. Ultrasonic degradation of DNA // *DNA*. 1989. V. 8. P. 697-701. doi: 10.1089/dna.1989.8.697
16. Garafutdinov R.R., Galimova A.A., Sakhabutdinova A.R. Polymerase chain reaction with nearby primers // *Anal. Biochem.* 2017. V. 518. P. 126-133. doi: 10.1016/j.ab.2016.11.017.
17. Garafutdinov R.R., Galimova A.A., Sakhabutdinova A.R. The influence of CpG (5'-d(CpG)-3' dinucleotides) methylation on ultrasonic DNA fragmentation // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2019. V. 37. P. 3877-3886. doi: 10.1080/07391102.2018.1533888
18. Golenberg E.M., Bickel A., Weihs P. Effect of highly fragmented DNA on PCR // *Nucleic Acids Res.* 1996. V. 24. P. 5026-5033. doi: 10.1093/nar/24.24.5026
19. Grokhovsky S.L., Il'icheva I.A., Nechipurenko D.Yu., Golovkin M.V., Panchenko L.A., Polozov R.V., Nechipurenko Yu.D. Sequence-specific ultrasonic cleavage of DNA // *Biophys. J.* 2011. V. 100. P. 117-125. doi: 10.1016/j.bpj.2010.10.052
20. Hagerman P.J. Investigation of the flexibility of DNA using transient electric birefringence // *Biopolymers*. 1981. V. 20. P. 1503-1535. doi: 10.1002/bip.1981.360200710
21. Larginho M., Santos H.M., Doria G., Scholz H., Baptista P.V., Capelo J.L. Development of a fast and efficient ultrasonic-based strategy for DNA fragmentation // *Talanta*. 2010. V. 81. P. 881-886. doi: 10.1016/j.talanta.2010.01.032
22. Mann T.L., Krull U.J. The application of ultrasound as a rapid method to provide DNA fragments suitable for detection by DNA biosensors // *Biosens. Bioelectron.* 2004. V. 20. P. 945-955. doi: 10.1016/j.bios.2004.06.021
23. Packer M.J., Dauncey M.P., Hunter C.A. Sequence-dependent DNA structure: tetranucleotide conformational maps // *J. Mol. Biol.* 2000. V. 295. P. 85-103. doi: 10.1006/jmbi.1999.3237
24. Poptsova M.S., Il'icheva I.A., Nechipurenko D.Yu., Panchenko L.A., Khodikov M.V., Oparina N.Y., Polozov R.V., Nechipurenko Yu.D., Grokhovsky S.L. Non-random DNA fragmentation in next-generation sequencing // *Sci. Reports*. 2014. V. 4. P. 4532. doi: 10.1038/srep04532
25. Taub M.A., Bravo H.C., Irizarry R.A. Overcoming bias and systematic errors in next generation sequencing data // *Genome Med.* 2010. V. 2. P. 87. doi: 10.1186/gm208

References

1. Ansorge W.J. Next-generation DNA sequencing techniques. *Nature Biotechnol.* 2009. V. 25. P. 195-203. doi: 10.1016/j.nbt.2008.12.009
2. Bikbulatova S.M., Chemeris D.A., Nikonov Yu.M., Mashkov O.I., Garafutdinov R.R., Chemeris A.V., Vakhitov V.A. Methods for detection of results of real-time polymerase chain reaction. *Vestn. Bashk. University*. 2012. V. 17(1). P. 59-67. (In Russian)
3. Chemeris D.A., Magdanov E.G., Mashkov O.I., Garafutdinov R.R., Chemeris A.V. Delayed or hot-start PCR. *Biomics*. 2011. V. 2(1). P. 1-8. (In Russian)
4. Chen Y.-C., Liu T., Yu C.-H., Chiang T.-Y., Hwang C.-C. Effects of GC bias in next-generation-sequencing

- data on de novo genome assembly. *PLoS ONE*. 2013. V. 8. e62856. doi: 10.1371/journal.pone.0062856
5. Elsner H.I., Lindblad E.B. Ultrasonic degradation of DNA. *DNA*. 1989. V. 8. P. 697-701. doi: 10.1089/dna.1989.8.697
6. Garafutdinov R.R., Galimova A.A., Sakhabutdinova A.R. Polymerase chain reaction with nearby primers. *Anal. Biochem.* 2017. V. 518. P. 126-133. doi: 10.1016/j.ab.2016.11.017
7. Garafutdinov R.R., Galimova A.A., Sakhabutdinova A.R., Chemeris A.V. PCR-based evaluation of sequence specificity of DNA fragmentation by ultrasound. *Mol. Biol. (Mosk)*. 2016. V. 50(2). P. 272-278. doi: 10.7868/S0026898416020051
8. Garafutdinov R.R., Galimova A.A., Sakhabutdinova A.R. The influence of CpG (5'-d(CpG)-3' dinucleotides) methylation on ultrasonic DNA fragmentation. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2019. V. 37. P. 3877-3886. doi: 10.1080/07391102.2018.1533888
9. Garafutdinov R.R., Galimova A.A., Sakhabutdinova A.R., Vakhitov V.A., Chemeris A.V. DNA amplification using PCR with abutting primers. *Mol. Biol. (Mosk)*. 2015. V. 49(4). P. 628-637. doi: 10.7868/S0026898415040059
10. Garafutdinov R.R., Nagaev N.R., Sakhabutdinova A.R., Chemeris A.V. Authenticity, preservation and availability of ancient DNA. *Vestn. Bashk. University*. 2015a. V. 20. P. 432-439. (In Russian)
11. Golenberg E.M., Bickel A., Weihs P. Effect of highly fragmented DNA on PCR. *Nucleic Acids Res.* 1996. V. 24. P. 5026-5033. doi: 10.1093/nar/24.24.5026
12. Grokhovsky S.L. Specificity of DNA cleavage by ultrasound. *Mol. Biol.* 2006. V. 40(2). P. 276-283. doi: 10.1134/S0026893306020142
13. Grokhovsky S.L., Il'icheva I.A., Nechipurenko D.Yu., Golovkin M.V., Panchenko L.A., Polozov R.V., Nechipurenko Yu.D. Sequence-specific ultrasonic cleavage of DNA // *Biophys. J.* 2011. V. 100. P. 117-125. doi: 10.1016/j.bpj.2010.10.052
14. Grokhovsky S.L., Il'icheva I.A., Nechipurenko Yu.D., Nechipurenko D.Yu., Panchenko L.A., Polozov R.V. Ultrasonic cleavage of DNA: quantitative analysis of sequence specificity. *Biophysics*. 2008. V. 53(3). P. 250-251.
15. Grokhovsky S.L., Il'icheva I.A., Golovkin M.V., Nechipurenko Y.D., Nechipurenko D.Y., Panchenko L.A., Polozov R.V. Ultrasonic cleavage of DNA in complexes with Ag(I), Cu(II), Hg(II). *Biophysics*. 2013. V. 58(1). P. 27-36. doi: 10.1134/S0006350913010065
16. Hagerman P.J. Investigation of the flexibility of DNA using transient electric birefringence. *Biopolymers*. 1981. V. 20. P. 1503-1535. doi: 10.1002/bip.1981.360200710
17. Larginho M., Santos H.M., Doria G., Scholz H., Baptista P.V., Capelo J.L. Development of a fast and efficient ultrasonic-based strategy for DNA fragmentation. *Talanta*. 2010. V. 81. P. 881-886. doi: 10.1016/j.talanta.2010.01.032
18. Mann T.L., Krull U.J. The application of ultrasound as a rapid method to provide DNA fragments suitable for detection by DNA biosensors. *Biosens. Bioelectron.* 2004. V. 20. P. 945-955. doi: 10.1016/j.bios.2004.06.021
19. Mashkov O.I., Poskryakov A.V., Nikolenko A.G., Garafutdinov R.R. Determination of the botanical origin of honey using PCR. *Beekeeping*. 2016. No.2. P. 56-58. (In Russian)
20. Mashkov O.I., Poskryakov A.V., Nikolenko A.G., Garafutdinov R.R. Establishment of the botanical origin of honey using polymerase chain reaction. *Biomics*. 2016a. V. 8(2). P. 154-160. (In Russian)
21. Nechipurenko Y.D., Golovkin M.V., Il'icheva I.A., Grokhovskii S.L., Nechipurenko D.Y., Panchenko L.A., Polozov R.V. Characteristics of ultrasonic cleavage of DNA. *J. Struct. Chem.* 2009. V. 50 (5). P. 1007-1013. doi: 10.1007/s10947-009-0149-1
22. Packer M.J., Dauncey M.P., Hunter C.A. Sequence-dependent DNA structure: tetranucleotide conformational maps. *J. Mol. Biol.* 2000. V. 295. P. 85-103. doi: 10.1006/jmbi.1999.3237
23. Poptsova M.S., Il'icheva I.A., Nechipurenko D.Yu., Panchenko L.A., Khodikov M.V., Oparina N.Y., Polozov R.V., Nechipurenko Yu.D., Grokhovsky S.L. Non-random DNA fragmentation in next-generation sequencing. *Sci. Reports*. 2014. V. 4. P. 4532. doi: 10.1038/srep04532
24. Sakhabutdinova A.R., Maksimova M.A., Garafutdinov R.R. Synthesis of Circular DNA Templates with T4 RNA Ligase for Rolling Circle Amplification. *Mol. Biol. (Mosk)*. 2017. V. 51(4). P. 724-733. doi: 10.7868/S0026898417040164
25. Taub M.A., Bravo H.C., Irizarry R.A. Overcoming bias and systematic errors in next generation sequencing data. *Genome Med.* 2010. V. 2. P. 87. doi: 10.1186/gm208