

ДНК-УЗНАЮЩИЕ ФЕРМЕНТЫ

Выщепление рестриктазой амплифицируемого фрагмента ДНК как способ исключения ошибочных результатов ПЦР в реальном времени с TaqMan зондом

А.Г. Акишев¹*, Н.А. Нетесова², М.А. Абдурашитов¹, С.Х. Дегтярев¹

¹ ООО «СибЭнзайм» Новосибирск

² ООО «Эпигенлаб» Новосибирск

* автор для переписки: Александр Акишев, ООО СибЭнзайм, ул. Тимакова, д. 2/12, Новосибирск, 630117, Россия; тел.: +7(383)333-4991; факс: +7(383)333-6853; E-mail: aki@sibenzyme.ru

ПЦР в реальном времени с использованием TaqMan зонда (ПЦР РВ) является одним из основных методов анализа структуры ДНК человека и широко используется в медицине. В данной работе проводили ПЦР РВ 4-х фрагментов геномной ДНК человека (chr1: 90717178-90717300, chr9: 97464604-97464756, chr11: 65647215-65647307, chr17: 4560027-4560175), используя в качестве матрицы препараты ДНК из крови человека, полученные как стандартным методом фенольной депротеинизации, так и выделенные на колонках. В ПЦР использовались как препараты исходной ДНК, так и после ее обработки рестриктазой, выщепляющей амплифицируемый фрагмент. В случае препаратов нативной ДНК, очищенных на колонках, ПЦР на 3-х из 4-х фрагментов ДНК дает завышенное значение Cq. В случае фенольной очистки завышенное значение Cq для препаратов нативной ДНК получается для 2-х из 4-х фрагментов ДНК. В случае препаратов ДНК, полученных после очистки на колонке, обработка ДНК эндонуклеазой рестрикции, вырезающей амплифицируемый фрагмент, приводит к получению нормальных значений Cq для всех четырех анализируемых фрагментов ДНК. Таким образом, ПЦР РВ с нативной ДНК, полученной очисткой на колонках, может давать завышение Cq, которое снимается, если предварительно провести гидролиз ДНК рестриктазой, выщепляющей ампликон.

Ключевые слова: рестриктазы, препараты ДНК из крови человека, ПЦР РВ

DOI: 10.26213/SE.2021.45.29.001

Данные для цитирования:

Акишев А.Г., Нетесова Н.А., Абдурашитов М.А., Дегтярев С.Х. (2021) Выщепление рестриктазой амплифицируемого фрагмента ДНК как способ исключения ошибочных результатов ПЦР в реальном времени с TaqMan зондом, ДНК-узнающие ферменты, том 2021(1), DOI: 10.26213/SE.2021.45.29.001

Эта статья доступна по лицензии Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International

ВВЕДЕНИЕ

На сегодня ПЦР в реальном времени с использованием TaqMan зонда (ПЦР РВ) повсеместно используется при анализе структуры ДНК человека и является одним из основных диагностических методов в медицине. Ранее мы показали, что использование рестриктаз для предварительного гидролиза ДНК-матрицы с целью выщепления амплифицируемого фрагмента позволяет проводить сравнительные исследования образования ПЦР-продукта на большой выборке препаратов ДНК [1-3]. В данной работе мы проводили ПЦР РВ 4-х фрагментов геномной ДНК человека, используя в качестве матрицы препараты ДНК из крови человека, полученные как стандартным методом фенольной депротеинизации, так и выделенные на колонках. При этом, ПЦР ставилась как на исходной ДНК, так и после ее обработки рестриктазой, в результате действия которой происходит вырезание амплифицируемого фрагмента.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. В работе использовали фенол (ОАО «Реактив», Новосибирск), хлороформ (ОАО «Реактив», Новосибирск), изоамиловый спирт (ОАО «Реактив», Новосибирск), РНКазу А (ООО «Самсон-Мед», Санкт-Петербург), SDS (ООО «Компания Хеликон», Москва). Реакционная смесь для пробоподготовки ДНК перед ПЦР, набор для очистки ДНК из легкой фракции клеток крови, олигонуклеотиды, рестриктазы Bst2UI, HinfI, MspI, бидистиллированная вода и буферные растворы производства ООО «СибЭнзайм».

Материалом для исследования служили образцы ДНК, выделенные из клеток крови 16 условно здоровых доноров. Препараты ДНК 8-ми доноров под номерами 205, 1086, 1087, 1137, 1151, 1205, 1437 и 1487 получали фенол-хлороформным методом как описано ранее [4] с некоторыми модификациями. В ходе очистки полученные препараты ДНК обрабатывались только РНКазой А без добавления рестриктазы TaqI. В случае других 8-ми препаратов под номерами 232, 235, 582, 558, 559, 604, 605 и 640 выделение ДНК проводили из легкой фракции клеток крови с доочисткой на спин-колонках как описано ранее [5]. Концентрацию полученных препаратов ДНК определяли спектрофотометрически.

Приготовление рестрикционной смеси проводилось как описано ниже. При проведении ПЦР РВ фрагмента ДНК 9-604 в пробирку на 1,5 мл отбирали «реакционную смесь для пробоподготовки ДНК перед ПЦР» в объеме 250 мкл и к ней добавляли 1 мкл (20 ед. акт) эндонуклеазы рестрикции HinfI (смесь А). При проведении ПЦР РВ фрагмента ДНК 1-178 в пробирку на 1,5 мл отбирали «реакционную смесь для пробоподготовки ДНК перед ПЦР» в объеме 250 мкл и к ней добавляли 1 мкл (20 ед. акт) эндонуклеазы рестрикции Bst2UI (смесь Б). При проведении ПЦР РВ фрагментов ДНК 17-027 и 11-215 в пробирку на 1,5 мл отбирали «реакционную смесь для пробоподготовки ДНК перед ПЦР» объеме 250 мкл и к ней добавляли 1 мкл (20 ед. акт) эндонуклеазы рестрикции MspI (смесь В).

Приготовление ПЦР-смесей. Для каждого из четырех фрагментов (с учетом того, что имеется 16 гидролизованных и 16 негидролизованных образцов ДНК) готовилось 940 мкл реакционной смеси для ПЦР, содержащей 714 мкл воды, 205 мкл 10х буфера для Hot Start Taq ДНК-полимеразы и 21 мкл 10 мМ смеси дезоксинуклеозидтрифосфатов. К полученной

смеси добавляли 77 мкл смеси праймеров и зонда (10 μ M каждый), специфичные для исследуемого фрагмента ДНК, и 12,8 мкл Hot Start Taq ДНК-полимеразы (5 ед. акт/мкл). Полученную ПЦР-смесь перемешивали.

Гидролиз ДНК крови рестриктазами проводили в пробирках для ПЦР (200 мкл). В каждой пробирке смешивали 13,5 мкл H_2O и 1,5 мкл ДНК образца, доведенного до концентрации около 18 нг/мкл. Для каждого исследуемого образца готовили по 2 пробирки ДНК. В одну пробирку добавляли 15,1 мкл реакционной смеси для пробоподготовки ДНК перед ПЦР, а в другую пробирку добавляли 15,1 мкл смеси А в случае анализа фрагмента ДНК 9-604, 15,1 мкл смеси Б в случае анализа фрагмента ДНК 1-178 или 15,1 мкл смеси В в случае анализа фрагментов ДНК 17-027 и 11-215. Для фрагмента ДНК 1-178 инкубацию проводили при 60 С, в остальных случаях – при 37 С. Время инкубации 30 минут.

Проведение ПЦР. После инкубации сбрасывали капли на микроцентрифуге и в каждую пробирку добавляли по 30,2 мкл ПЦР-смеси. После перемешивания из каждой пробирки ее содержимое (60 мкл) разносили по 20 мкл в лунку ПЦР-планшеты на 96 лунок.

Для расчета специфических праймеров и зондов использовали нуклеотидные последовательности из базы данных GenBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) по версии генома человека GRCh38/hg38, семейство программ “Vector NTI 11.5” (Invitrogen, США) и онлайн-ресурс «BLAST» (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Ниже указана структура праймеров и флуоресцентно меченого зонда, используемых в работе:

9-604z 5' FAM-TGTGAGCCACTGTGACCAGCCCC-BHQ1 3'(24)

9-604d 5' CCTCGGCCTCCAGAGTGC 3'(19)

9-604r 5' CCTGCTGCCATCTTTGGTTCC 3' (21)

17-027z 5' TCAAAGGTCCCCAGCCCCAA 3'(21)

17-027r 5' CCAAGCCAGCCTCTGTCCCA 3'(20)

17-027d 5' GGGGTGTGGCAGGCAGGAG 3'(19)

11-215z 5' CCACCGCCGAGGGATGAAGACC 3'(23)

11-215d 5' TGGTGCCTCGGGTAAGCG 3'(19)

11-215r 5' CCC AGG CCA CAC GGA ACT TTC 3'(21)

1-178z 5' CCGCCGTTCAAGCAGCCGCC 3'(20)

1-178r 5' CGGCGGCAACATTGTTTGGT 3'(20)

1-178d 5' GGC CCC TTC CAT TGT CAT TGC T 3'(22)

ПЦР РВ проводили согласно протоколу производителя [6] в объеме 20 мкл на детектирующем амплификаторе CFX-96 («Bio-Rad», США) по следующей программе: для фрагментов 9-604, 17-027, 1-178:

- при 95°C — 3 мин;
- 5 «слепых» циклов: 95°C — 10 сек, 69°C (с понижением на 0.7°C в каждом последующем цикле) — 20 сек, 72°C — 10 сек, 75°C — 5 сек;
- 40 циклов: 95°C — 10 сек, 65°C — 20 сек (с детекцией флуоресцентного сигнала в канале FAM), 72°C — 10 сек, 75°C — 5 сек;

для фрагмента 11-215:

- при 95°C — 3 мин;

- 5 «слепых» циклов: 95°C — 10 сек, 69°C (с понижением на 0.5°C в каждом последующем цикле) — 20 сек, 72°C — 10 сек, 75°C — 5 сек;
- 40 циклов: 95°C — 10 сек, 66°C — 20 сек (с детекцией флуоресцентного сигнала в канале FAM), 72°C — 10 сек, 75°C — 5 сек.

По завершении ПЦР, при помощи программного обеспечения амплификатора “Bio-Rad CFX Manager v.2.1”, устанавливали среднее значение C_q и значение среднеквадратичного отклонения для анализируемых образцов и полученные данные заносили в таблицу.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В работе изучались препараты ДНК крови 16 доноров, полученные как стандартным методом фенольной очистки, так и с помощью набора для выделения ДНК [7]. В числе доноров были 7 мужчин и 9 женщин. В таблице 1 представлены пол и возраст доноров (столбики 2 и 3, соответственно), а также концентрация полученных препаратов ДНК (столбик 4) и характеристика их чистоты, определяемой отношением оптической плотности при 260 нм и 280 нм (столбик 5). Синим фоном выделены номера препаратов ДНК, полученные фенольной очисткой.

Таблица 1

Пол и возраст доноров крови, концентрация и фотометрическая чистота полученной ДНК крови.

№ донора	Пол	Возраст, лет	Концентрация ДНК, нг/мкл	A260/A280
232	ж	42	74	1,80
235	м	54	35	1,90
558	ж	68	54	1,90
559	ж	66	20	1,90
582	м	33	54	1,90
604	ж	36	52	1.90
605	м	54	50	2,00
640	м	43	48	1,80
205	ж	72	461	1.80
1086	м	36	193	1.70
1087	ж	51	95	1.70
1137	ж	59	299	1.60
1151	ж	50	225	1.70
1205	м	65	420	1.70
1437	м	68	213	1.80
1487	ж	22	406	1.70

Как видно из таблицы, выделенные препараты ДНК имеют концентрацию в диапазоне от 20 нг/мкл до 461 нг/мкл и чистоту не ниже 1,6 по соотношению A260/A280.

С полученными препаратами ДНК, как исходными, так и после расщепления одной из трех эндонуклеаз рестрикции (Bst2UI, HinfI, MspI), проводилась ПЦР в реальном времени,

как указано в «Материалах и Методах». Для каждого из 4-х амплифицируемых фрагментов гидролиз препаратов ДНК рестриктазами Bst2UI (фрагмент 1-178), HinfI (фрагмент 9-604) и MspI (фрагменты 17-027 и 11-215) приводит к выщеплению анализируемого фрагмента, что позволяет избежать влияния остальной ДНК на результаты ПЦР.

Нами проводился ПЦР РВ 4-х фрагментов ДНК, название которых соответствует позиции 5'-конца ампликона в геноме и включает номер хромосомы и последние три цифры его положения. Например, название фрагмента 9-604 соответствует положению его 5'-конца в позиции chr9: 97464604.

На рисунке 1 представлены нуклеотидные последовательности 4-х участков геномной ДНК, анализируемые в данной работе. В каждом участке ДНК фиолетовым фоном выделены сайты узнавания рестриктазы, окаймляющие амплифицируемый участок. Зоны связывания прямого и обратного праймеров, а также флуоресцентно-меченого TaqMan-зонда выделены желтым, голубым и зеленым фоном, соответственно.

Рисунок 1

Нуклеотидные последовательности участков генома, выбранных для проведения ПЦР.

chr9: 97464604-97464756 – amplicon 153 bp, GC-состав 49%, гидролиз HinfI

>NC_000009.12:97464443-97464862 Homo sapiens chromosome 9, GRCh38.p13 Primary Assembly

```
CACCTCCTGGGTTCAAGCCGATTCCTCTGCCTTAGCCTCCCAAGTAGCTGGGACTACAGGCGCCACCC
CCACACCCAGCTAATTTTTGTATTTTTAGTAGAGATAGGATTTACCATATTGGCCAGGCTGGTCTCA
AACTCCTGACCTTGTGATCTGCCTGCCTCGGCCTCCYAGAGTGCCTGGGATTACAGGTGTGAGCCACT
GTGACCAGCCCCCTTATCTTCTTTTTCAAGAGATAAGTATTTCACTGAATACACGTTCTCCTCCCTGTT
GATATAAGCAAGTCTGAGACTGGAACCAAAGATGGCAGCAGGGAAGGACAAAAACGAA
TTCCTATTGCTTTTCTTCTTAGGTTACTTCAATTCATTCTCTTTAACTGATTCAGGTATGTGG
GCAAAGACTATTC
```

chr17: 4560027-4560175 – amplicon 149 bp, GC-состав 67%, гидролиз MspI

>NC_000017.11:4559727-4560419 Homo sapiens chromosome 17, GRCh38.p13 Primary Assembly

```
GGCCAGGTTCCGGGCAGCCCGCCAGCCTTGTTCTGCAGAGGGGGGGTGTCTGAGCCACGGCTG
GGACAGAGGGATGCCCAAGGACCCCAAGAGACCCCAAGGGAATATTTCCCAAAGTTTTGATTTAGC
AAGAGGAGCACAAGTCAGCCAAGGAGAAAGGGCTTCTTGCCAGCGGGTGCATCTGGGCAGACAT
GGGGATGGGAAAGCATCTGGGGAAACTGAGCCTAGCTAGGGAGGGAGCCTCTGGAGGGGAGATT
GGTGGGGCAGAGTCCACTCAGGTGGGAGGGAGGCCAGTGGGGTGTGGCAGGCAGGAGAGAAG
GGGCTGGGGAGCAGGCCAGCCAGGCGTAGTCAGGCCCAACCTGCCAGCAGGTGCCTCCTGCAC
```

CAGGAC TTGGGGGCTGGGGACCTTTGACAAAGCAGCAGAT TGGGACAGAGGCTGGCTTGGTACAAA
TGTCCCTCCAGATGCACAGACTTTTGGATTGGGTCAGGCCAAGTCTCGGGCTACAGCCTGGGTTTTCCC
CCAAATTGACCGTACAGTGCCTGGAGCTAAACCCAGCGGGGAGTCGCCTGGTCCCCCTGAGGGGCT
CCAGAGAGAGGGACTTGCCAACCTCAAGCCTGGGGAGCCTGGTGCCAGACCCCTCCCTTACTTACC
TGGAAGAGTCCTGGTGCCT CCGGGGGTTTAGAACCAG

chr 11: 65647215-65647307 – amplicon 93 bp, GC-состав 68%, гидролиз MspI

>NC_000011.10:65647185-65647370 Homo sapiens chromosome 11, GRCh38.p13 Primary Assembly

GCCAGCCCCGGGGCTTGGCAAGG CCGGAACT TGGTGCCCTCGGGTAAGCGACTTCTGGTCTTCATCC
CTCGGGCGGTGGCACACGCGGCCCTCGGGGACTGTGGAAAGTTCCGTGTGGCCTGGGACGCAGTC
CAGGGGGCGGGCGCTGGGGCGGCCACCTC CCGGCAGCCCCGCCACTCGTCCC

chr 1: 90717178-90717300 – amplicon 123 bp, GC-состав 54%, гидролиз Bst2UI

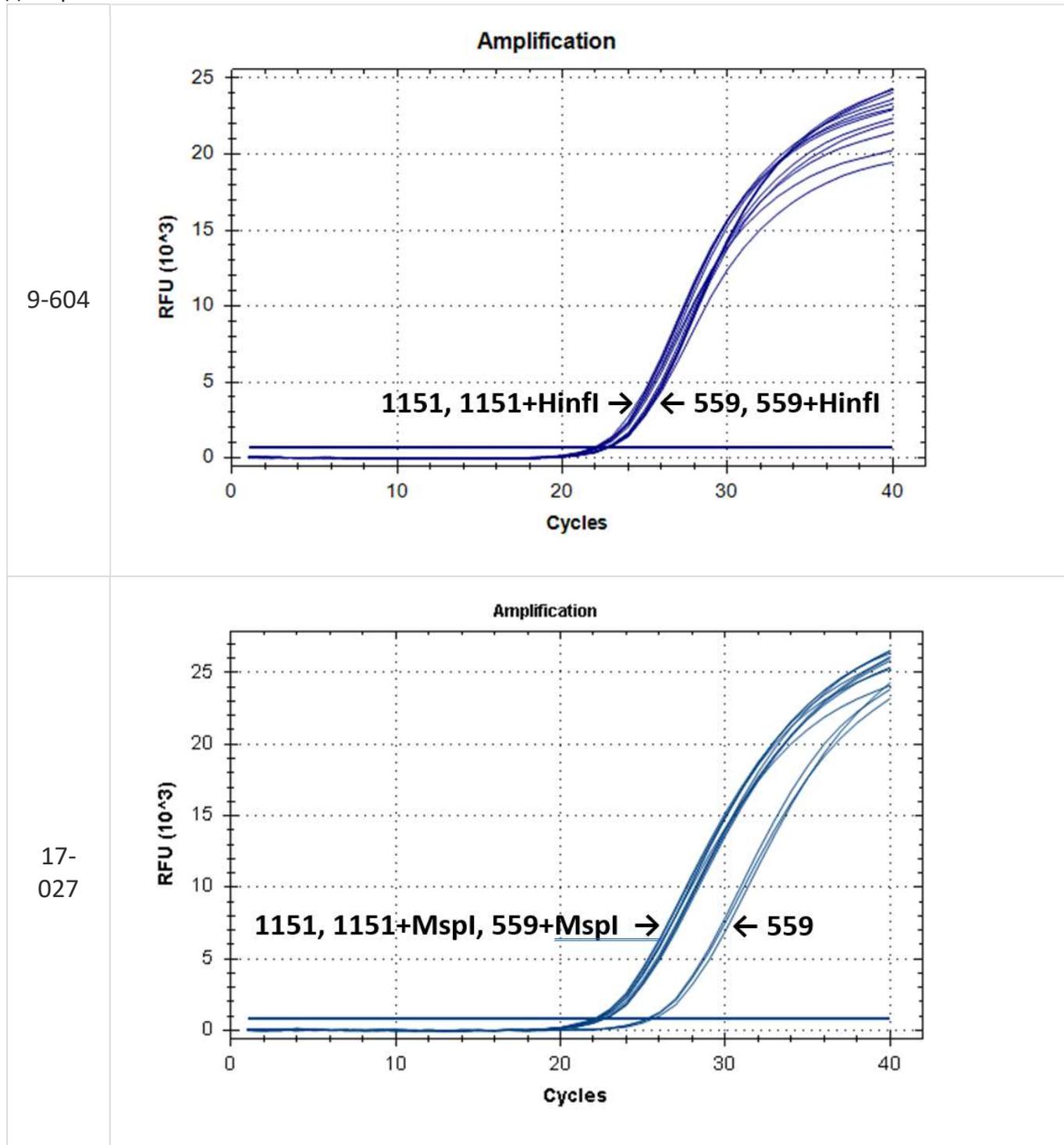
>NC_000001.11:90717100-90717499 Homo sapiens chromosome 1, GRCh38.p13 Primary Assembly

GAAATCTCCATTCATCATG CCTGGGCTGCCTGAACTGGCACTGGACAAAATCGTGTCTATTCCAAAAC
TCGACCCGCT GGCCCTTCCATTGTCATTGCTACATGAGGTCCACGCCACT CCGCCGTT CAGCAGCCG
CCCGAACCAGCGAAGAAAGCTATCGATCGTAAAACAAAATAAAC ACCAAACAATGTTGCCGCCGCT
TAAAAAAAAAAAAAGTGGGGCGGGGAGAGAAGGAAGGGTAATTGGGAAGTGGCAATCTGTGGATA
CTTTCGACACAACTTTTTTTCTTTTATGCAAAAAGTAGGGGTGGAAAGAAAAAAGATGCGGGGGGC
GGGGGGAGTAAAAAAAAATTTCTGAGAAAACCTCGGAACTTGCCT C CAGGAACGACTGCGCACGTGG
C

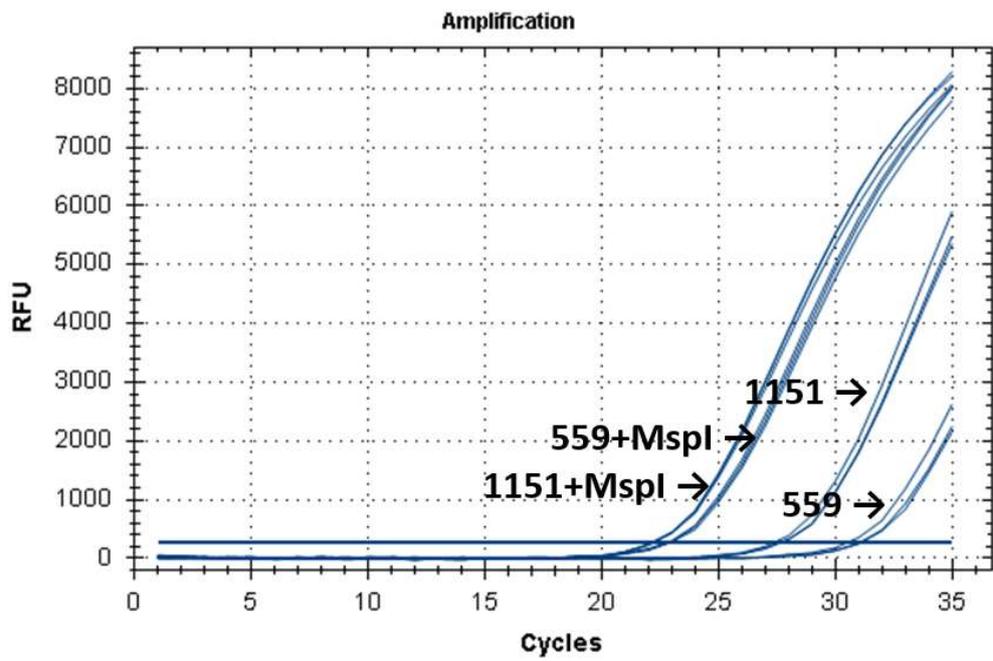
На рисунке 2 представлены кривые флуоресценции ПЦР РВ для образцов ДНК №1151 (выделение фенольным методом) и №559 (выделение на колонке).

Рисунок 2

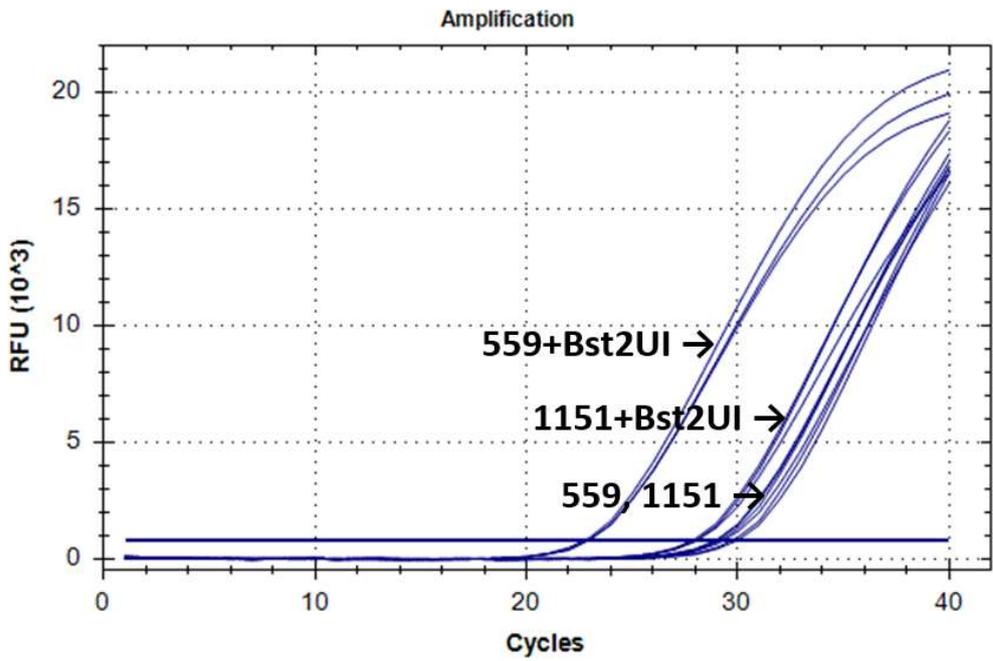
Кривые флуоресценции ПЦР-анализа 4-х фрагментов генома человека в препаратах ДНК доноров №559 и №1151.



11-215



1-178



В таблице 2 представлены результаты ПЦР РВ 4-х фрагментов генома человека в 16-ти препаратах ДНК крови доноров.

Таблица 2

Значения S_q , полученные в ПЦР РВ 4-х выбранных фрагментов генома человека в 16-ти препаратах ДНК крови доноров. Синим фоном выделены номера препаратов ДНК, полученные фенольной очисткой.

№	9-604 + Hinfl	9-604	17-027 + MspI	17-027	11-215 + MspI	11-215	1-178 + Bst2UI	1-178
232	22,27±0,05	22,30±0,09	22,24±0,09	24,35±0,23	22,26±0,10	30,60±0,53	22,34±0,02	28,61±0,04
235	23,40±0,07	23,47±0,05	23,30±0,06	25,47±0,17	23,32±0,10	31,11±0,31	23,46±0,06	29,51±1,05
558	22,14±0,11	22,39±0,06	22,19±0,05	24,59±0,61	22,35±0,05	30,13±0,11	22,38±0,13	28,84±0,43
559	22,72±0,10	22,82±0,09	22,66±0,08	25,41±0,20	22,77±0,08	30,83±0,34	22,79±0,11	29,26±0,37
582	22,25±0,04	22,49±0,08	22,31±0,06	24,66±0,13	22,31±0,11	31,08±1,12	22,30±0,07	28,63±0,16
604	22,54±0,03	22,84±0,03	22,76±0,21	25,05±0,28	22,91±0,28	30,79±1,36	22,58±0,03	28,86±0,09
605	22,02±0,06	22,14±0,06	22,23±0,11	24,60±0,06	22,41±0,13	31,41±1,28	22,10±0,01	29,07±0,23
640	22,22±0,07	22,34±0,06	22,34±0,03	24,86±0,09	22,36±0,07	31,47±1,13	22,21±0,01	28,90±0,33
205	21,26±0,05	21,41±0,07	21,27±0,05	21,30±0,12	21,06±0,04	27,27±0,31	23,87±0,07	26,36±0,21
1086	21,87±0,05	21,96±0,06	22,02±0,17	22,11±0,06	21,99±0,09	28,35±0,38	27,94±0,27	28,99±0,17
1087	21,42±0,10	21,41±0,07	21,39±0,04	21,55±0,03	21,32±0,04	25,21±0,03	28,45±0,12	28,81±0,31
1137	21,46±0,06	21,60±0,18	21,56±0,06	21,70±0,10	21,65±0,10	27,21±0,11	27,36±0,37	28,99±0,17
1151	22,05±0,08	22,19±0,11	22,13±0,04	22,28±0,07	22,11±0,04	27,47±0,16	27,92±0,13	29,30±0,54
1205	21,41±0,09	21,54±0,08	21,54±0,09	21,65±0,08	21,74±0,28	27,13±0,13	26,71±0,29	28,00±0,16
1437	21,20±0,06	21,34±0,10	21,18±0,01	21,75±0,05	21,20±0,18	27,16±0,23	23,02±0,05	25,66±0,14
1487	21,84±0,06	22,09±0,06	22,00±0,02	22,39±0,06	21,34±0,15	27,66±0,28	24,66±0,22	27,04±0,35

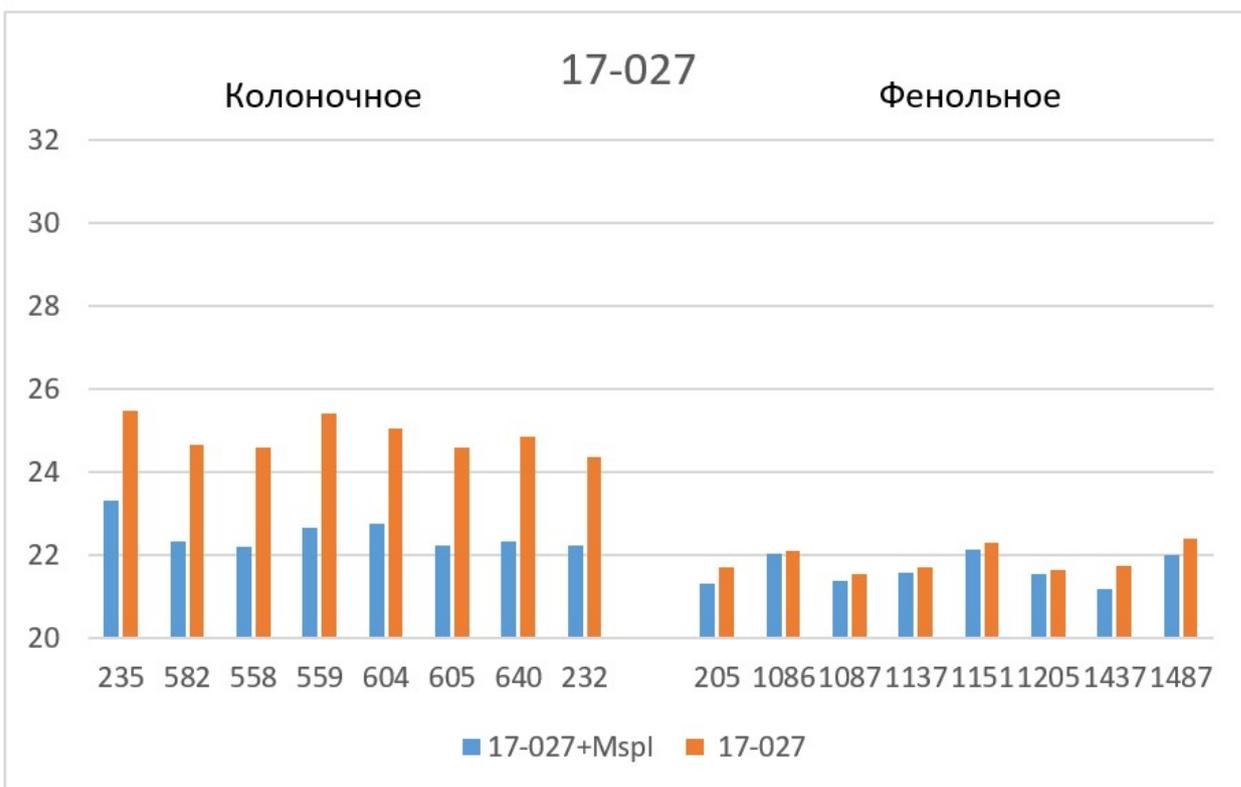
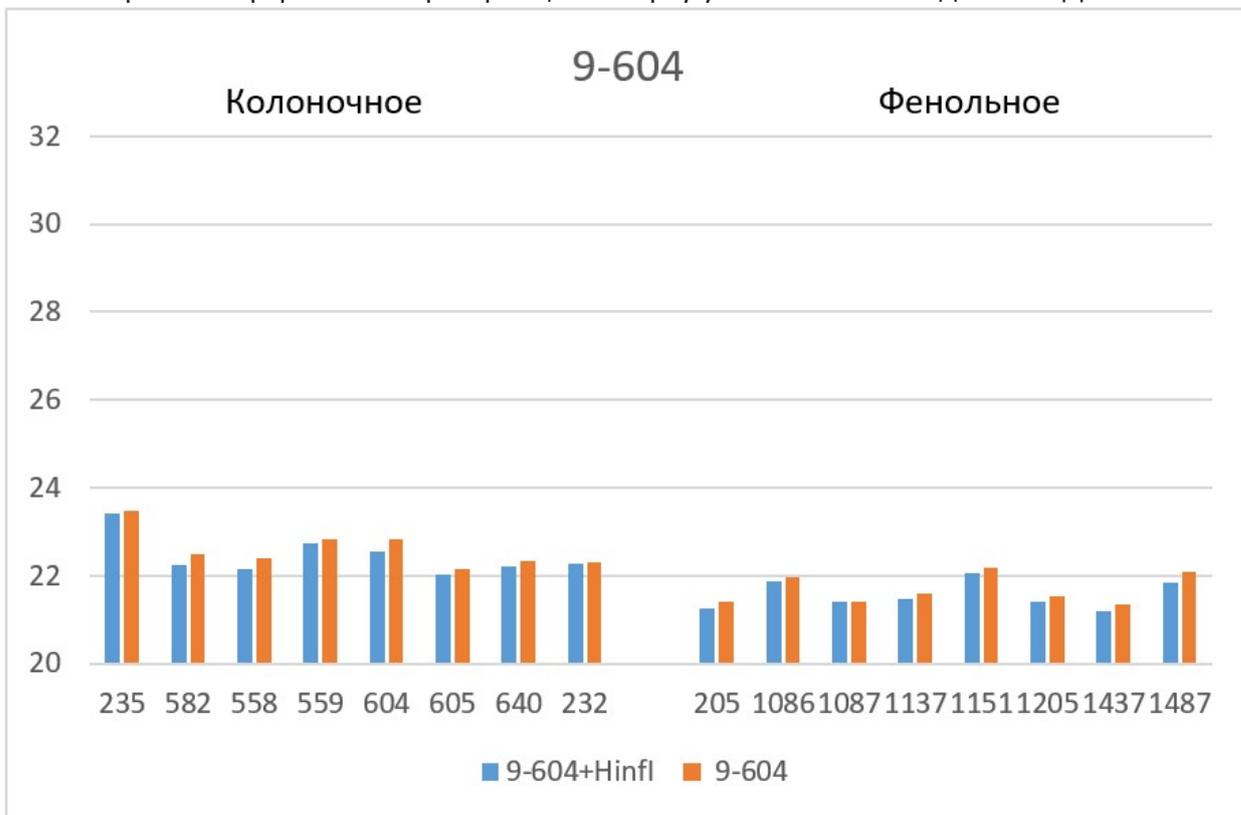
Как видно из таблицы 2 для каждого образца ДНК значения S_q , полученные при проведении ПЦР РВ на нативной ДНК либо больше, либо совпадают со значениями S_q , полученными при проведении ПЦР на гидролизованной ДНК. При этом, значения S_q для всех 16 образцов исходной ДНК в случае фрагмента 9-604 (столбик 3) и для 8-ми препаратов исходной ДНК после фенольной очистки в случае фрагмента 17-027 (нижняя половина столбика 5), а также значения S_q для образцов гидролизованной ДНК в случае всех 4-х фрагментов (за исключением фрагмента 1-178 на препаратах ДНК после фенольной очистки, столбики 2, 4, 6 и верхняя половина столбика 8) практически совпадают между собой для каждого из образцов ДНК. Эти близкие значения S_q для каждого образца ДНК (базовые значения), вероятно, соответствуют реальному значению S_q для искомого препарата ДНК, связанному обратно пропорциональной зависимостью с количеством анализируемых молекул геномной ДНК человека, в которой каждый из четырех изучаемых фрагментов представлен в одной копии.

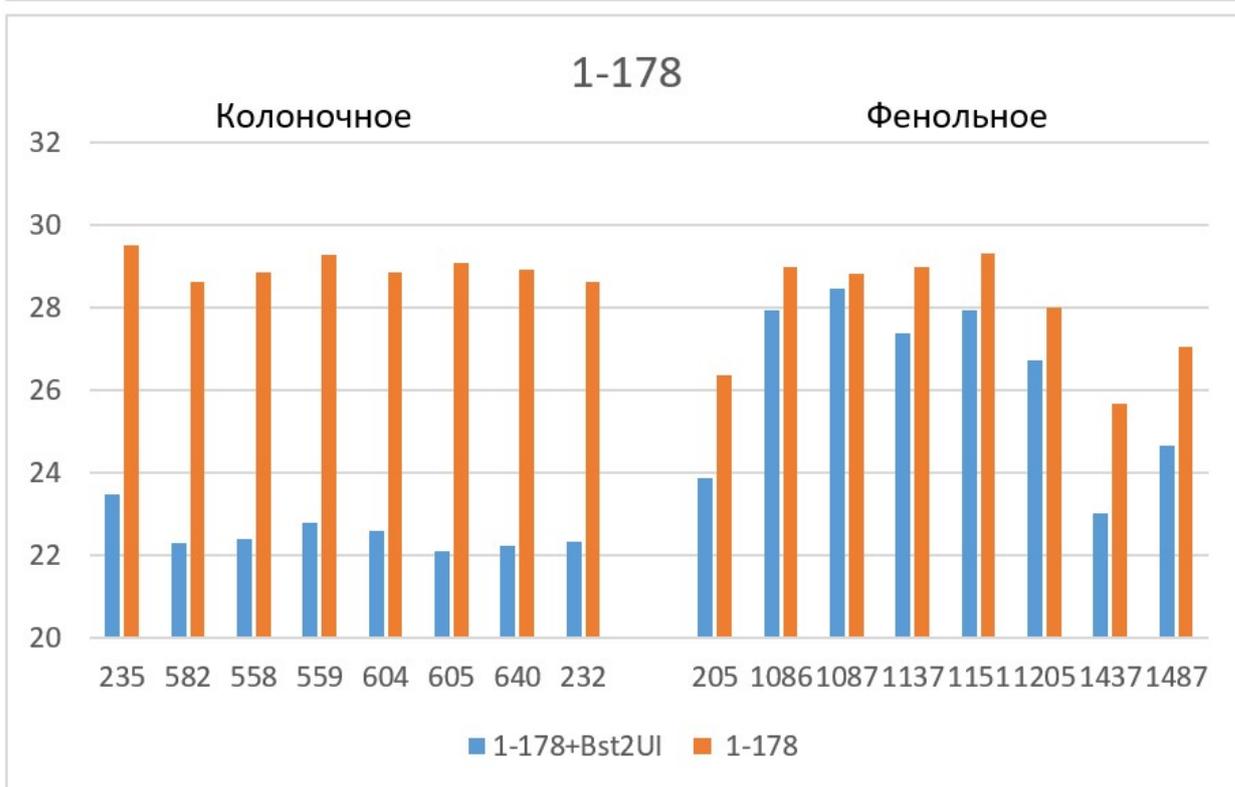
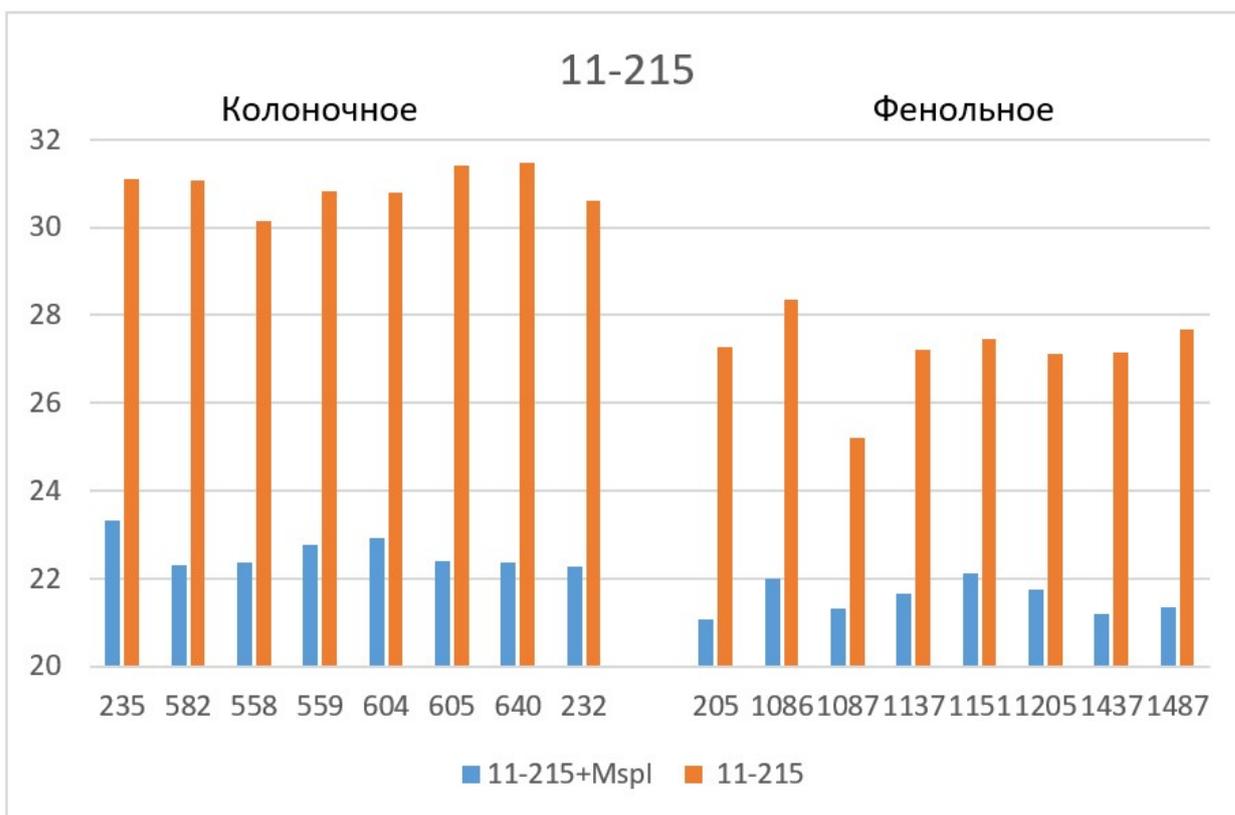
Завышенные значения S_q наблюдаются для трех фрагментов. 1) в случае фрагмента 17-027 значения S_q для препаратов нативной ДНК, очищенных на колонке, на 2 – 2,5 цикла больше, чем базовые значения (верхняя половина столбика 5); 2) в случае фрагмента 11-215 завышение S_q относительно базовых значений составляет для препаратов ДНК после фенольной очистки около 6 циклов, а для препаратов ДНК после колоночной очистки –

около 8 циклов (столбик 7); и, наконец, 3) в случае фрагмента 1-178 наблюдается завышение C_q не только в случае всех препаратов нативной ДНК (столбик 9), но и в случае препаратов ДНК после фенольной очистки, которые гидролизовались рестриктазой Bst2UI (нижняя половина столбика 8).

Рисунок 3

Сравнение средних значений C_q для ПЦР РВ четырех участков геномов 16-ти доноров до и после обработки ферментами рестрикции. Сверху указан способ выделения ДНК.





На рисунке 3 полученные значения C_q представлены в виде диаграмм. Как видно из диаграмм после обработки ДНК рестриктазой, выщепляющей амплифицируемый фрагмент, значения C_q на всех фрагментах (кроме 1-178 в случае фенольной очистки) опускаются до базовых значений для каждого образца ДНК. Эффект завышения величины C_q при ПЦР на нативной ДНК может быть связан с влиянием соседних участков протяженных молекул ДНК, препятствующих амплификации, а также с возможными взаимодействиями протяженных молекул ДНК между собой. В дальнейшей работе мы

планируем более детально изучить влияние участков ДНК вне ампликона на ПЦР РВ с ТаqMan зондом.

Таким образом, при проведении ПЦР РВ необходимо использовать препараты ДНК, полученные методом очистки на колонке и предварительно обработанные рестриктазой, выщепляющей амплифицируемый фрагмент. ПЦР РВ препаратов ДНК, полученных фенольным методом, также как ПЦР РВ без обработки ДНК соответствующей рестриктазой, могут привести к получению завышенных значений Cq.

Литература

1. **А.Г. Акишев, Н.А. Нетесова, М.А. Абдурашитов, С.Х. Дегтярев** Определение полиморфизма 5mC/T в повторе AluSx (CHR16: 75033884) в препаратах ДНК из крови человека методами Glal- и FatI-ПЦР анализа // Эпигенетическая ДНК диагностика, DOI: [10.26213/SE.2021.11.76.001](https://doi.org/10.26213/SE.2021.11.76.001) (2021).
2. **А.Г. Акишев, Н.А. Нетесова, М.А. Абдурашитов, С.Х. Дегтярев** Определение полиморфизма 5mC/T в позиции Chr1: 245618129 в препаратах ДНК из крови человека методами Glal- и FatI-ПЦР анализа // Эпигенетическая ДНК диагностика, DOI: [10.26213/SE.2019.69.42836](https://doi.org/10.26213/SE.2019.69.42836) (2021).
3. **А.Г. Акишев, Н.А. Нетесова, М.А. Абдурашитов, И.В. Вихлянов, М.К. Никитин, А.Б. Карпов, С.Х. Дегтярев** Оценка риска возникновения рака молочной железы и рака желудка путем определения вариантов полиморфизма 5mC/T в интроне гена KIF26B в положении хр1: 245618129 // Эпигенетическая ДНК диагностика, DOI: [10.26213/SE.2019.78.40307](https://doi.org/10.26213/SE.2019.78.40307) (2021).
4. **EV Dubinin, AG Akishev, MA Abdurashitov, SB Oleynikova, VL Sitko, and S Kh Degtyarev** *Real time Glal-PCR assay of regulation regions of human genes HDAC4, RARB and URB1* // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences, vol 7(2), pp. 667-676 (2016).
5. Инструкция к набору для очистки ДНК из легкой фракции клеток крови // https://sibenzyme.com/wp-content/uploads/k008s-instruction-manual_rus_v.1.2-1.pdf
6. Системы ПЦР реального времени с флуоресцентной детекцией CFX96. Руководство по эксплуатации // https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/russian_federation/russian/literature/10021337_ru.pdf
7. Набор для очистки ДНК из легкой фракции клеток крови // <https://sibenzyme.com/product/k008/>