

УДК 54.02:542.6:577.113.083

ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ СРЕД ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ИЗ КЛЕТОК ХЕМОЛИТОТРОФНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Рогатых С.В.

*Научно-исследовательский геотехнологический центр Дальневосточного отделения
Российской академии наук, Петропавловск-Камчатский, e-mail: rogarykhsv@yandex.ru*

В статье приведено описание основных коммерческих и экспериментальных методик выделения ДНК из клеток микроорганизмов. Достоверность молекулярно-биологических методов, используемых при анализе структуры сообществ микроорганизмов, зависит от качества и репрезентативности препарата ДНК, полученного в процессе выделения из биоматериала. Оптимальный метод выделения ДНК должен обеспечивать эффективное отмывание прикрепленных бактериальных клеток от частичек грунта, лизис клеток и очистку от ингибиторов. Проведено экспериментальное сравнение нескольких комбинированных протоколов выделения ДНК, основанных на различных типах воздействия на клетки эубактерий и архей. Проанализированы методики, основанные на физическом (перетирание клеток с частицами SiO_2), ферментативном (обработка протеиназой К и лизоцимом), химическом (обработка GuSCN и CTAB) воздействии на клетки и комбинированная методика, основанная на щелочном лизисе (KOH) в присутствии низкомолекулярного полимера полиэтиленгликоля ($\text{PEG}-200$). Рекомендовано использовать для проведения молекулярного анализа структуры сообществ acidophilic хемолитотрофных микроорганизмов методику, основанную на лизирующей активности гуанидинизотиоцианата.

Ключевые слова: нуклеиновая кислота, хемолитотрофные микроорганизмы, протеиназа, гуанидинизотиоцианат, выделение ДНК, оксид кремния

CHEMICAL COMPOSITION OF ENVIRON FOR ISOLATION OF DNA FROM CELLS OF CHEMOLITHOTROPHIC MICROORGANISMS

Rogatykh S.V.

*Scientific research geotechnological centre Far Eastern Branch of Russian Academy of Sciences,
Petropavlovsk-Kamchatsky, e-mail: rogarykhsv@yandex.ru*

The article describes the main commercial and experimental techniques for isolating DNA from microbial cells. The reliability of the molecular biological methods used in the analysis of the structure of microorganism communities depends on the quality and representativeness of the DNA preparation obtained in the process of isolation from the biomaterial. The optimal method of DNA isolation should provide effective washing of attached bacterial cells from soil particles, cell lysis and purification from inhibitors. Several combined DNA extraction protocols based on different types of effects on eubacterial and archaic cells have been compared experimentally. Methods based on physical (grinding of cells with SiO_2 particles), enzymatic (treatment with proteinase K and lysozyme), chemical (treatment with GuSCN and CTAB), exposure to cells and a combined technique based on alkaline lysis (KOH) in the presence of a low molecular weight polyethylene glycol polymer $\text{PEG}-200$). It is recommended to use a technique based on the lysing activity of guanidinium isothiocyanate for molecular analysis of the structure of the communities of acidophilic chemolithotrophic microorganisms.

Keywords: nucleic acid, chemolithotrophic microorganisms, proteinase, guanidinothiocyanate, DNA isolation, silicon oxide

При применении методик идентификации хемолитотрофных организмов с использованием разновидностей полимеразной цепной реакции особенно остро встаёт вопрос о методах выделения и очистки бактериальной хромосомной ДНК. Ещё более важным он становится при использовании разновидностей ПЦР, в ходе которых проводится количественный анализ (ПЦР в реальном времени и т.д.). Наличие нелизированных клеток вносит в той или иной мере существенные погрешности в результаты количественного анализа и в ряде случаев может привести к недостоверным результатам.

Некоторые методы выделения ДНК могут вносить искажение в результат количе-

ственного анализа за счёт неэффективного лизиса клеток, сорбции ДНК на частичках грунта, наличия в препарате ферментативных и других ингибиторов, а также потери ДНК или нарушения ее структуры. Кроме того, качество препарата оказывает влияние на достоверность анализа, основанного на методах прямого определения нуклеотидной последовательности (секвенирования) и клонирования, широко применяемых при изучении структуры сообществ [1, 2].

Существует множество способов воздействия на клетки с целью их разрушения и последующей очистки содержащихся в них нуклеиновых кислот: химический,

физический и ферментативный. К самым распространенным физическим способам относятся обработка ультразвуком, нагревание, механическое перетирание и разрушение клеточной стенки методом замораживания/оттаивания [3]. Химические способы разрушения клеток основаны на лизирующей активности некоторых солей и детергентов. И, наконец, к третьему распространенному способу воздействий относятся ферментативные подходы, использующие активность протеолитических ферментов (лизозима и протеиназы К). Следует отметить, что наиболее распространенные методы выделения ДНК практически всегда представляют собой комплексный подход, включающий несколько этапов пробоподготовки.

В связи с этим целью работы стала апробация нескольких способов выделения ДНК и выбор метода, наиболее подходящего для анализа накопительных культур сообществ ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов. Получаемая смесь нуклеиновых кислот должна быть репрезентативной и, по возможности, сохранять количественное соотношение копий геномов каждого вида, входящего в состав пробы. Выполнение последнего условия необходимо для проведения точного количественного анализа сообществ.

Основной проблемой, которая должна была быть учтена при выборе методики выделения бактериальной ДНК, является неоднородность свойств данных микроорганизмов, среди которых особенно следует выделить свойства их клеточных стенок. Как известно, лизис грамположительных бактерий и архей (сходных по строению клеточной стенки с грамположительными эубактериями) осуществить гораздо сложнее по сравнению с лизисом грамотрицательных бактерий. А поскольку среди исследуемых микроорганизмов присутствуют представители всех вышеупомянутых групп, остро встает задача выбора универсальной методики выделения ДНК.

Для выделения ДНК (РНК) из клеток их необходимо предварительно лизировать. Пробоподготовка проводится также для удаления из полученного материала ингибиторов Taq-полимеразы (белковых примесей и др.) и различных РНКаз. Обработка проб проводится в микроцентрифужных пробирках типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл. Время обработки в зависимости от метода доходит до 3–4 ч.

На данный момент существует целый ряд методов для выделения ДНК из клеток. Анализ методик выделения ДНК наиболее целесообразно проводить среди методов, используемых с этой целью в практике клинического молекулярно-биологического анализа, поскольку большинство этих методов имеют относительно универсальный характер.

Следует отметить также достаточно низкий уровень освещенности подобных методов в русскоязычной литературе. По-видимому, это связано с тем, что большинство лабораторий используют для выделения и очистки ДНК заводские наборы, при работе с которыми используются приписанные к ним протоколы.

Целью данной работы является анализ существующих методик выделения ДНК и выявление наиболее приемлемых из них для выделения хромосомного генетического материала из хемолитотрофных ацидофильных микроорганизмов, принадлежащих к родам *Acidithiobacillus*, *Sulfobacillus* и *Ferroplasma*.

Приведем небольшой обзор методов выделения ДНК, используемых в клинической и лабораторно-диагностической практике, и анализ возможностей их применения.

Метод выделения ДНК одношаговый с использованием «Tri reagent». Проба смешивается с 500 мкл 0,9% раствора хлорида натрия и центрифугируется при 5000 об/мин в течение 10 мин дважды с заменой супернатанта 0,9% раствором NaCl. Затем осадок обрабатывают лизирующим раствором – раствором «Tri reagent» фирмы Sigma (США) с добавлением детергентов (pH 8,0) и инкубируют при +95 °С в термостате или кипящей водяной бане в течение 10 мин. Далее центрифугируют для осаждения нелизируемых клеточных структур и капель жидкостей на стенках пробирки. Данный метод рекомендуется для выделения ДНК из клеток, культур клеток и монослойной ткани из цельной крови, плазмы или сыворотки.

Метод выделения ДНК путем термического лизиса в присутствии сорбента. Вместо лизирующего раствора для лизиса клеток применяется высокая температура. В пробу добавляют катиониты, которые связывают белки, и кипятят на водяной бане в течение 5–10 мин. Если в дальнейшем выделенная ДНК будет использована для классической ПЦР, а не для её разновидностей, и при наличии чистых культур, для выделения можно воспользоваться модифицированной методикой – с отсут-

ствием сорбента. Культуральный материал ресуспендируют в 100 мкл ТЕ (10 мМ ТрисHCl pH8.0, 1мМ ЭДТА). Затем кипятят на водяной бане в течение 3 мин. Центрифугируют в течение 15 мин при 12000 об/мин. Супернатант можно использовать для ПЦР-амплификации. Основным плюсом этого метода являются его высокая скорость и относительная простота исполнения. А к наиболее значимым недостаткам следует отнести вероятность попадания в выделенный образец примесей, ингибирующих ПЦР.

Метод выделения ДНК с помощью фенольно-спиртовой депротеинизации получил широкое распространение, и его модификации используются в качестве основных способов экстракции ДНК. В пробирку вносят 0,9 мл лизирующего буферного раствора, 22 мл 0,2 М раствора ЭДТА, 2,6 г Тритона X 100 и 40 мкл суспензии сорбента, встряхивают на вортексе и прибавляют 50 мкл исследуемого материала. Встряхивают 5 с, оставляют при комнатной температуре на 15 мин, вновь встряхивают 5 с и центрифугируют 15 с при 12000 об/мин. Супернатант удаляют, осадок сорбента отмывают дважды, сначала отмывающим раствором, а затем 2 раза 70 % этанолом и один раз ацетоном (все промывающие жидкости вносят в пробирку в объеме 0,5 мл). Затем пробирки с открытыми колпачками прогревают в течение 10 мин при 56 °С в микротермостате. К высушенным осадкам добавляют 50–75 мкл элюирующего буфера. Пробирки закрывают крышками и недолго встряхивают на вортексе, инкубируют при 56 °С в течение 10 мин, вновь встряхивают на вортексе и центрифугируют 2 мин при 12000 об/мин. Супернатант содержит ДНК и РНК и пригоден для амплификации.

Выделение ДНК путем гуанидинтиоцианат-фенол-хлороформной экстракции. Метод применяется для выделения ДНК, клеточной мРНК, а также вирусных ДНК и РНК. В настоящее время он упрощен благодаря комбинации денатурирующего агента (гуанидинтиоцианата) и фенола в одном растворе. В пробирку «Эппендорф» помещают 3 мкл носителя нуклеиновых кислот. Затем добавляют 900 мкл денатурирующего раствора и через 15 мин – 200 мкл хлороформа. Центрифугируют 12000 об/мин в течение 5 мин. Полученный супернатант переносят в другую пробирку с 700 мкл изопропанола, оставляя растворы на 15 мин при комнатной температуре. Затем пробу центрифугируют 10 мин при 12000 об/мин, удаляют супернатант и осадок обмывают 0,5 мл 70 % этанола. Центрифугируют 5 мин при 12000 об/мин и удаляют супернатант. Высушивают полученный осадок, а затем растворяют в 30 мкл буфера для растворения. Оставляют на 15 мин при комнатной температуре, затем перемешивают и центрифугируют 5–10 с. Фирма «Sigma» (США) предложила вместо хлороформа, который является высокотоксичным веществом, использовать 1-бром-3-хлоропропан, не уступающий по своим свойствам, но значительно менее опасный.

Метод экстракции ДНК с использованием набора «DIAtom™ DNA Prep». Данный метод является одним из наиболее эффективных для выделения ДНК с минимальной продолжительностью экстрагирования (25 мин для 4–8 жидких проб), не уступающий, а в ряде случаев и превосходящий зарекомендованные аналоги и по своим характеристикам предназначенный для выделения ДНК из различных биологических материалов (жидкостей, мелкоизмельченных твердых материалов, пятен крови и т.д.), а также для быстрой очистки ДНК из клинических проб (цельной крови, плазмы, сыворотки, мочи, соскобов слизистой и т.д.).

Принцип действия набора «DIAtom™ DNA Prep» основан на использовании лизирующего агента с гуанидинтиоцианатом, который предназначен для разрушения клеток, а также денатурации клеточных нуклеаз. В присутствии лизирующего реагента ДНК активно сорбируется на NucleoS™ сорбенте, затем легко отмывается от солей и белков спиртовым раствором. ДНК, элюированная из сорбента Экстра-Геном™ или чистой водой, может исследоваться различными методами, в том числе с участием разновидностей полимеразной цепной реакции.

Метод выделения ДНК с применением набора «ExtraGene™ DNA Prep». Метод предназначен для быстрого (не более одного часа) выделения ДНК из цельной крови, пятен крови или других биологических жидкостей, из клеточных суспензий. Метод не требует использования фенола с хлороформом и осаждения ДНК этиловым спиртом. Для выделения используется ExtraGene™ смола и протеиназа К. Принцип действия отечественного набора ExtraGene™ DNA основан на использовании смолы (смеси ионообменников) для обессоливания среды сорбции низкомолекулярных пептидов и хелатирования (маскировки) двухзаряд-

ных катионов металлов (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} и т.д.) и применении протеиназы К для инактивации нуклеаз и других ингибиторов белковой природы. При этом ДНК остается в супернатанте растворенной и свободной, готовой к использованию непосредственно в амплификационных реакциях без дальнейшей очистки [4].

Метод сорбции на силикагеле предполагает лизис микроорганизмов в концентрированном растворе гуанидинтиоцианата, кроме этого обеспечивается сорбция ДНК или РНК на частицах силикагеля в суспензии. Далее после четырех промывок и центрифугирования суммарная нуклеиновая кислота элюируется с высушенного силикагеля водой или слабосолевым буфером.

Для оценки эффективности методов выделения ДНК из смешанных культур, а также для выбора наиболее удобной и универсальной методики нами были отобраны несколько комбинированных протоколов очистки ДНК основанных на различных типах воздействия на клеточную стенку бактерий. Были проанализированы методики, основанные на механическом (перетирание клеток с частицами SiO_2) [5], ферментативном (обработка протеиназой К и лизоцимом) [6], химическом (обработка $GuSCN$ [7] и СТАВ) воздействии на клеточные стенки бактерий, а также применена комбинированная методика щелочного лизиса (КОН) в присутствии низкомолекулярного полимера (PEG-200). В выделение во всех случаях брали 500 мкл образца. Перед этапом лизиса пробы промывали фосфатным буфером (рН 1,8) два раза. После каждой промывки клетки и частицы грунта осаждали центрифугированием при 13000 об/мин в течение 10 минут.

При перетирании с частицами SiO_2 осадок ресуспендировали в 200 мкл раствора содержащего 20 % ДДС (100 мМ NaCl, 500 мМ Tris (рН 8,0), 20 % ДДС), к раствору добавляли 20 мкл раствора частиц SiO_2 (0,005 г/л) производства «SigmaAldrich» (США) в ТЕ-буфере. Перемешивали в течение 5–10 мин. После сорбции ДНК частицы осаждали центрифугированием, супернатант удаляли. ДНК элюировали в 100 мкл воды при температуре 60 °С. Ферментативный способ лизиса заключался в ресуспендировании осадка в 500 мкл буфера (100 мМ NaCl, 100 мМ Tris, 1 мМ цитрата натрия, 5 мМ $CaCl_2$, 25 мМ ЭДТА, рН 8,0). К раствору добавляли 60 мкл лизоцима (0,1 г/л) «Fermentas» (Литва) и инкубиро-

вали при температуре 37 °С в течение 40 мин. Добавляли 10 мкл 20 % ДДС, 60 мкл протеиназы К (20 мг/мл) «Fermentas», инкубировали при 50 °С в течение 30 мин. При обработке СТАВ осадок ресуспендировали в 500 мкл лизирующего буфера (0,2 М Tris-HCl, рН 8,0, 0,05 М ЭДТА, 2 М NaCl, 2 %-ный СТАВ), инкубировали в течение 30 мин при температуре 65 °С. При обработке КОН осадок ресуспендировали в 500 мкл лизирующего буфера (10 % ПЭГ – 200, 20 мМ КОН), инкубировали 10 мин при температуре 98 °С.

Модификация методики с гуанидинтиоцианатом заключается в том, что образцы культур объемом 500 мкл центрифугируют на 13000 об/мин в течение 5 минут, после чего «отмывают» осадок в фосфатном буфере PBS для удаления ингибирующих ПЦР примесей. После подобных процедур выделение ДНК следует производить по стандартному протоколу, несколько отличающемуся от стандартной методики.

К 200 мкл образца культуры добавляем 400 мкл лизирующего раствора (5,25 М $GuSCN$, 50 мМ Tris, рН 6,4, 20 мМ ЭДТА, 1,3 % тритон), перемешиваем и термостатируем при 65 °С 30 мин. Добавляем 400 мкл водонасыщенного фенола (рН 7,2), перемешиваем. Добавляем 400 мкл смеси хлороформа и 100 %-ного изоамилового спирта в соотношении 24:1, перемешиваем. Центрифугируем в течение 10 минут при 13000 об/мин. Верхнюю водную фазу переносим в новую пробирку, добавляем 800 мкл смеси хлороформа и изоамилового спирта в соотношении 24:1, перемешиваем. Центрифугируем в течение 10 минут при 13000 об/мин. Верхнюю фазу переносим в новую пробирку, добавляем 400 мкл изопропанола, перемешиваем. Центрифугируем в течение 5 минут при 13000 об/мин. Удаляем надосадочную жидкость, добавляем 800 мкл 70 %-ного этанола, перемешиваем. Центрифугируем в течение 5 минут при 13000 об/мин. Удаляем надосадочную жидкость, осадок высушиваем в термостате при температуре 55 °С не более 10 минут. Растворяем осадок в 50 мкл ТЕ-буфера путём периодического перемешивания и нагрева при 55 °С.

После этапа лизиса проводили очистку от ингибиторов с помощью стандартной методики фенол-хлороформной экстракции [8]. После преципитации ДНК растворяли в 50 мкл ТЕ-буфера.

Рассмотренные нами методики выделения и очистки хромосомной бактериальной

ДНК являются относительно универсальными, а значит, могут быть использованы при работе с хемолитотрофными микроорганизмами. При экспериментальном подтверждении выбранные нами методы продемонстрировали значительные отличия в эффективности выделения нуклеиновых кислот из предоставленных накопительных культур. Это может объясняться и различной эффективностью очистки от ингибиторов, и комплексным составом исследованных образцов [9].

Наилучший результат получен для методики, основанной на лизирующей активности GuSCN. Сходный по эффективности результат был получен для ферментативной методики, однако в данном случае на результат оказали влияние остатки бактериальных нуклеиновых кислот, содержащиеся в реагентах, использованных при выделении ДНК. Использование ферментов при выделении ДНК приводит к значительному сдвигу кривой контроля выделения.

Показана низкая эффективность методик, основанных на лизирующей активности бромида цетилтриметиламмония (СТАВ) и на физическом воздействии на клетки с помощью частиц SiO₂. Для методики, основанной на лизирующей активности КОН, в присутствии PEG-200, получен средний результат, однако ее принципиальным недостатком является низкая степень очистки препарата ДНК от ингибиторов, в частности ионов железа, содержащихся в некоторых культуральных средах. В то же время этот метод показал лучший результат для проб, содержащих микроорганизмы, не окисляющие железо.

Полученные результаты позволяют рекомендовать для проведения молекулярного анализа структуры сообществ ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов методику, основанную на лизирующей активности GuSCN с последующей очисткой фенолом и хлороформом, поскольку данная методика является апробированной на культурах хемолитотрофных микроорганизмов, достаточно освещена в литературе и может осуществляться при помощи стандартных наборов для выделения ДНК. Данная методика может быть использована для самых различных разновидностей ПЦР, в том числе и для количественной real-time ПЦР [10]. Она может быть реализована при использовании набора «Проба-НК» производства НПО «ДНК-Технология». Однако из-за большого количества стадий добавления

и удаления растворов при работе с образцом требуется высокая степень аккуратности, т.к. возможна перекрёстная контаминация между пробами образующейся аэрозолью ДНК [11].

К числу рекомендуемых следует отнести также метод выделения ДНК путем ферментативного лизиса. При эффективном апробировании данного метода на практике его можно отнести к числу пригодных и рекомендуемых для выделения хромосомной бактериальной ДНК хемолитотрофных микроорганизмов, принадлежащих к родам *Acidithiobacillus*, *Sulfobacillus* и *Ferroplasma*.

Список литературы

1. Schneegurt M.A., Dore S.Y., Kulpa C.F.Jr. Direct extraction of DNA from soils for studies in microbial ecology // Curr. Issues Mol. Biol. – 2003. – vol. 5, № 1. – P. 1–8.
2. Sanger F., Coulson A. R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase // J. Mol. Biol. – 1975. – vol. 94, № 3. – P. 441–448.
3. Zammit C.M., Mutch L.A., Watkin E.L.J., Watling H.R. Evaluation of quantitative real-time polymerase chain reaction for enumeration of biomining microorganisms in culture // Hydrometallurgy. – 2008. – vol. 94, № 1–4. – P. 185–189.
4. Chomczynski P., Rymaszewski M. Alkaline PEG-based method for direct PCR from Bacteria, Eukaryotic tissue samples, and whole blood // BioTechniques. – 2006. – vol. 40, № 4. – P. 454–458.
5. Boyle J.S., Lew A.M. An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification // Trends in Genetics. – 1995. – vol. 11, № 1. – P. 8.
6. Liu C.Q., Plumb J., Hendry P. Rapid specific detection and quantification of bacteria and archaea involved in mineral sulfide bioleaching using real-time PCR. Biotechnology and Bioengineering. – 2006. – vol. 94, № 2. – P. 330–336.
7. Данилевич В.Н., Гришин Е.В. Способ выделения геномной ДНК из клеток микроорганизмов // Патент России № 2177035. 2001. Бюл. № 35.
8. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction // Anal. Biochem. – 1987. – vol. 162, № 1. – P. 156–159.
9. Рогатых С.В. Оценка качественного и количественного состава сообществ культивируемых ацидофильных микроорганизмов методами ПЦР-РВ и анализа библиотек клонов / С.В. Рогатых, А.А. Докшукина, О.О. Левенец, С.В. Мурадов, И.А. Кофиади // Микробиология. – 2013. – Т.82, № 2. – С. 212–217.
10. Yue-li H., Dick W.A., Tuovinen O.H. PCR amplification of 16S rDNA sequences in Fe-rich sediment of coal refuse drainage // Biotechnology letters. – 2002. – vol. 24, № 13. – P. 1049–1053.
11. Kermekchiev M.B., Kirilova L.I., Vail E.E., Barnes W.M. Mutants of Taq DNA polymerase resistant to PCR inhibitors allow DNA amplification from whole blood and crude soil samples // Nucleic Acids Research. – 2009. – vol. 37, № 5. – P. 40.

References

1. Schneegurt M.A., Dore S.Y., Kulpa C.F.Jr. Direct extraction of DNA from soils for studies in microbial ecology // Curr. Issues Mol. Biol. 2003. vol. 5, no. 1. pp. 1–8.
2. Sanger F., Coulson A. R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase // J. Mol. Biol. 1975. vol. 94, no. 3. pp. 441–448.

3. Zammit C.M., Mutch L.A., Watkin E.L.J., Watling H.R. Evaluation of quantitative real-time polymerase chain reaction for enumeration of biomining microorganisms in culture // *Hydrometallurgy*. 2008. vol. 94, no. 1–4. pp. 185–189.
4. Chomczynski P., Rymaszewski M. Alkaline PEG-based method for direct PCR from Bacteria, Eukaryotic tissue samples, and whole blood // *BioTechniques*. 2006. vol. 40, no. 4. pp. 454–458.
5. Boyle J.S., Lew A.M. An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification // *Trends in Genetics*. 1995. vol. 11, no. 1. pp. 8.
6. Liu C.Q., Plumb J., Hendry P. Rapid specific detection and quantification of bacteria and archaea involved in mineral sulfide bioleaching using real-time PCR. *Biotechnology and Bioengineering*. 2006. vol. 94, no. 2. pp. 330–336.
7. Danilevich V.N., Grishin E.V. Sposob vydelenija genomnoj DNK iz kletok mikroorganizmov // *Patent Rossii* no. 2177035. 2001. Bjul. no. 35.
8. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction // *Anal. Biochem*. 1987. vol. 162, no. 1. pp. 156–159.
9. Rogatyh S.V. Ocenka kachestvennogo i kolichestvennogo sostava soobshhestv kultiviruemyh acidofilnyh mikroorganizmov metodami PCR-RV i analiza biblioteki klonov / S.V. Rogatyh, A.A. Dokshukina, O.O. Levenec, S.V. Muradov, I.A. Kofiadi // *Mikrobiologija*. 2013. T.82, no. 2. pp. 212–217.
10. Yue-li H., Dick W.A., Tuovinen O.H. PCR amplification of 16S rDNA sequences in fe-rich sediment of coal refuse drainage // *Biotechnology letters*. 2002. vol. 24, no. 13. pp. 1049–1053.
11. Kermekchiev M.B., Kirilova L.I., Vail E.E., Barnes W.M. Mutants of Taq DNA polymerase resistant to PCR inhibitors allow DNA amplification from whole blood and crude soil samples // *Nucleic Acids Research*. 2009. vol. 37, no. 5. pp. 40.