

УДК 616.24-006.6-074:577.112+577.113
<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2025-1-134-140>

Эффективность двух доступных наборов для амплификации трех нуклеотидных полиморфизмов, содержащих GC-богатые участки: 181946 G/A (rs2293347), -191 C/A (rs712830) и -216G/T (rs712829), у больных немелкоклеточным раком легкого

Юришич В.¹, Обрадович Я.², Павлович С.³, Тошич Н.³, Гуляева Л.Ф.⁴, Герштейн Е.С.⁵, Кушлинский Н.Е.⁵

¹ Факультет медицинских наук, Крагуевацкий университет
Сербия, 34000, г. Крагуевац, ул. Светозара Марковича, 69

² Институт биологии и экологии, Крагуевацкий университет
Сербия, 34000, г. Крагуевац, ул. Радоя Домановича, 12

³ Институт молекулярной генетики и геномной инженерии, Белградский университет
Сербия, 11000, г. Белград, ул. Студенческий пр., 1

⁴ Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины (ФИЦ ФТМ)
Россия, 630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

⁵ Национальный медицинский исследовательский центр (НМИЦ) онкологии им. Н.Н. Блохина
Россия, 115522, г. Москва, Каширское шоссе, 24

РЕЗЮМЕ

Цель исследования – сравнительный анализ двух доступных наборов, содержащих в одной реакционной смеси все реагенты и добавки, включая 100 mM Tris-HCl, 100 mM KCL, 4 mM MgSO₄, 0,2% of Tween 20, необходимых для амплификации трех наиболее часто встречающихся у больных немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ) полиморфизмов гена рецептора эпидермального фактора роста EGFR: 181946 G/A (rs2293347), -191 C/A (rs712830) и -216G/T (rs712829).

Материалы и методы. Протокол для генотипирования 181946C>T, 191C>A и -216G/T был уточнен в соответствии с ранее представленными данными. Продукты полимеразной цепной реакции (ПЦР) размером 197 bp детектировали с помощью электрофореза в 2%-м агарозном геле с последующим окрашиванием этидиум бромидом.

Результаты. Наборы реактивов Biomaster HS Taq-PCR Color 2× и Biomaster LR HS PCR 2× были эффективны для амплификации 181946 G/A, локализованной в интроне гена EGFR. Кроме того, полиморфизмы -191 C/A (rs712829) и -216G/T (rs712829), расположенные в промоторном участке и содержащие чрезвычайно высокое количество GC, успешно амплифицировались с помощью набора Biomaster LR HS PCR 2×.

Заключение. В настоящем исследовании показано, что наборы реактивов Biomaster HS Taq-PCR Color 2× и Biomaster LR HS PCR 2× эффективны для амплификации 181946 G/A, локализованного в интроне гена EGFR. Кроме того, EGFR SNP -191 C/A, локализованный в промоторном участке с крайне высоким содержанием GC-пар, успешно амплифицировался с помощью набора реактивов Biomaster LR HS PCR 2х.

Ключевые слова: добавки, амплификация, EGFR, НМРЛ, полиморфизм, ПЦР, реагенты

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования. Эта работа частично поддерживалась Министерством образования, науки и технологического развития Республики Сербия (№ 451-03-137/2025-03/200111, 451-03-136/2025-03/200378).

Соответствие принципам этики. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании. Исследование одобрено локальным этическим комитетом НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина (протокол № 5 от 02.10.2022).

Для цитирования: Юришич В., Обрадович Я., Павлович С., Тошич Н., Гуляева Л.Ф., Герштейн Е.С., Кушлинский Н.Е. Эффективность двух доступных наборов для амплификации трех нуклеотидных полиморфизмов, содержащих GC-богатые участки: 181946 G/A (rs2293347), -191 C/A (rs712830) и -216G/T (rs712829), у больных немелкоклеточным раком легкого. *Бюллетень сибирской медицины*. 2025;24(1):134–140. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2025-1-134-140>.

Efficiency of two available kits for amplification of three EGFR SNPs in patients with NSCLC: 181946 G/A (rs2293347), -191 C/A (rs712830) and -216G/T (rs712829) with GC-rich regions

Jurišić V.¹, Obradović J.², Tošić N., Pavlović S.³, Gulaeva L.F.⁴, Gershtein E.S.⁵, Kushlinskii N.E.⁵

¹ Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
69, Svetozar Markovic Str., Kragujevac, 34000, Republic Serbia

² Institute of Biology and Ecology, Faculty of Science, University of Kragujevac
12, Radoja Domanovicha Str., Kragujevac, 34000, Republic Serbia

³ Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, University of Belgrade
1, Student Ave., Belgrade, 11000, Republic Serbia

⁴ University of Medicine
52, Krasny Av., Novosibirsk, 630091, Russian Federation

⁵ N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology,
24, Kashirskoye highway, Moscow, 115522, Russian Federation

ABSTRACT

Aim. To conduct a comparative analysis of two available kits that contain all necessary reagents and additives in a single reaction mixture, including 100 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 4 mM MgSO₄, 0.2% of Tween 20, for the amplification of the three most common EGFR (epidermal growth factor receptor) gene polymorphisms in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC): 181946 G/A (rs2293347), -191 C/A (rs712830) and -216G/T (rs712829).

Materials and methods. The protocol for genotyping 181946C>T, 191C>A and -216G/T was refined according to previously reported data. Polymerase chain reaction (PCR) products measuring 197 bp were detected using electrophoresis in a 2% agarose gel, followed by staining with ethidium bromide.

Results. The Biomaster HS Taq-PCR Color 2× and Biomaster LR HS PCR 2× reagent kits were effective for amplification of 181946 G/A polymorphism located in the intron of the *EGFR* gene. Additionally, polymorphisms -191 C/A (rs712829) and -216G/T (rs712829), located in the promoter region and containing a high GC content, were successfully amplified using the Biomaster LR HS PCR 2× kit.

Conclusion. The present study shows that the Biomaster HS Taq-PCR Color 2× and Biomaster LR HS PCR 2× reagent kits are effective for amplification of 181946 G/A polymorphism located in the intron of the *EGFR* gene. Furthermore, the EGFR SNP -191 C/A, located in the promoter region with a high GC content, was successfully amplified using the Biomaster LR HS PCR 2× reagent kit.

Keywords: additives, amplification, EGFR, NSCLC, polymorphism, PCR, reagents

Conflict of Interest. The authors declare the absence of obvious or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of Financing. This study was partially supported by the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia.

Conformity with the principles of ethics. All patients signed an informed consent to participate in the study. The study was approved by the local Ethics Committee at N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology (Protocol No. 5 of 2.10.2022).

For citation: Jurišić V., Obradović J, Tošić N, Pavlović S., Gulaeva L.F., Gershtein E.S., Kushlinskii N.E. Efficiency of two available kits for amplification of three EGFR SNPs in patients with NSCLC: 181946 G/A (rs2293347), -191 C/A (rs712830) and -216G/T (rs712829) with GC-rich regions. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2025;24(1):134–140. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2025-1-134-140>.

ВВЕДЕНИЕ

Рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) принадлежит к семейству рецепторных тирозинкиназ. Он оказывает большое влияние на рост и дифференцировку как клеток нормального легкого, так и клеток рака легкого, а его онкогенный потенциал давно обнаружен и хорошо доказан [1–3]. Несколько описанных ранее однонуклеотидных полиморфизмов (SNPs) гена *EGFR* ассоциированы с регуляцией синтеза рецепторного белка [1, 2, 4]. Учитывая роль *EGFR* в канцерогенезе, пролиферации и дифференцировке, исследование полиморфизмов *EGFR* у больных немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ) имеет большое значение [3]. Однако промоторный участок *EGFR*, который мы исследовали, – один из регионов с крайне высоким содержанием гуанин-цитозиновых (GC) пар нуклеотидов, которые составляют до 75,45% [5], поэтому его амплификация должна проводиться в особых условиях.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – используемый во всем мире метод выявления мутаций гена *EGFR*. Однако требуется особая оптимизация каждого протокола ПЦР, в особенности в тех случаях, когда амплифицируют GC-богатые участки, поскольку они имеют тенденцию к формированию вторичных структур, прерывающих стандартную ПЦР-амплификацию [6–8]. Ранее мы показали, что для амплификации SNPs в промоторном участке *EGFR* требуется трудоемкая стратегия оптимизации протокола ПЦР [5, 9]. До недавнего времени не существовало наборов, содержащих полную реакционную смесь для амплификации таких сложных GC-богатых участков. В данном исследовании мы впервые протестировали наборы Biomaster LR HS PCR 2× (BiolabMix, Россия) и HS Taq-PCR Color 2× (BiolabMix, Россия) с готовыми реакционными смесями для амплификации двух SNP: 181946 G/A и -191 C/A с помощью

метода ПЦР с рестрикцией длины фрагмента, содержащего полиморфизм (restriction fragment length polymorphism, RFLP).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Наборы QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Германия) и DNA Kits (Invitrogen/Life Technologies, Карлсбад, США) были использованы для выделения ДНК из крови здоровых доноров и парафиновых блоков фиксированных в формалине опухолевых тканей больных НМРЛ соответственно. Как минимум три анализа были выполнены в каждой из исследованных групп. Идентичный образец из каждой группы – это образец, использованный для определения одного и того же полиморфизма. Материал делили таким образом, чтобы тестируемые реагенты всегда проверялись на одном и том же образце, чтобы избежать ошибок и неправильных результатов.

Концентрацию ДНК в полученных образцах в обоих случаях определяли с помощью Qubit® Fluorometer (Invitrogen/Life Technologies, США). Исследование и использование образцов тканей в научных целях одобрено местным этическим комитетом.

Протокол для генотипирования 181946C>T был уточнен в соответствии с ранее представленными данными [4] с небольшими модификациями, а именно: температурный профиль ПЦР при использовании KAPA Taq Hot Start PCR Kits состоял из исходной денатурации (95 °C, 5 мин); 45 циклов денатурации (94 °C, 30 с), отжига при (55 °C, 30 с) и удлинения (72 °C, 60 с), а также финального удлинения (72 °C, 7 мин). Суммарный объем реакционной смеси для ПЦР составлял 25 µl, включая 0,5 µl геномной ДНК, 0,4 µM каждого праймера, 0,2 mM каждого из dNTPs, магния в концентрации, соответствующей 1,7 mM MgCl₂, и 1 U KAPA Taq DNA polymerase в 1× PCR буфере.

ра А. Продукты ПЦР размером 244 бп детектировали с помощью электрофореза в 2%-м агарозном геле с последующим окрашиванием этидиум бромидом.

Для генотипирования 191C>A и -216G/T полиморфизма EGFR использовали ранее описанный протокол [1] с несколькими модификациями [5, 9]. Все ПЦР проводили с помощью КАРА Taq Hot Start PCR Kits (Кара Biosystems, США). Температурный профиль состоял из исходной денатурации (95 °C, 5 мин); 45 циклов денатурации (94°C, 30 с), отжига (63 °C, 30 с) и удлинения (72 °C, 60 с), а также финального удлинения (72 °C, 7 мин). Суммарный объем реакционной смеси для ПЦР составлял 25 µl, включая 0,4 µl геномной ДНК, 0,4 µM каждого праймера, 0,2 mM каждого из dNTPs, 1,5 M бетаина и 1 U КАРА Taq DNA polymerase в 1× PCR буфера А (с 1,5 mM MgCl₂). Продукты ПЦР размером 197 бп детектировали с помощью электрофореза в 2%-м агарозном геле с последующим окрашиванием этидиум бромидом.

Biomaster HS Taq-PCR Color 2× (BiolabMix, Россия) и Biomaster LR HS PCR 2× (BiolabMix, Россия), содержащие 100 mM Tris-HCl, 100 mM KCL, 4 mM MgSO₄, по 0,2% Tween 20 и DMSO, были протестированы в соответствии с инструкциями производителя и приведены в соответствие с теми же протоколами PCR-RFLP для обоих SNP. Реакцию ПЦР проводили в суммарном объеме 25 µl с 0,4 или 0,5 µl геномной ДНК и 0,4 µM каждого из праймеров. Температурные профили реакций соответствовали описанным ранее.

Для расщепления RFLP -191C>A использовали рестриктазу Cfr42I, (Fermentas/Thermo Fisher Scientific, Вильнюс, Литва), а для расщепления RFLP 181946C>T – рестриктазу Fast Digest TfiI, (PfeI) (Fermentas/Thermo Fisher Scientific, Вильнюс, Литва). Продукты реакции детектировали с помощью электрофореза в 3%-м агарозном геле.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Это исследование показало эффективность изученных наборов для амплификации трех наиболее важных полиморфизмов гена *EGFR*, содержащих GC-богатые участки, в образцах тканей больных НМРЛ. Для 181946 G/A анализ методом ПЦР с помощью обоих наборов Biomaster приводил к образованию фрагмента размером 244 бп (рис. 1). Ни один из наборов не влиял на результаты последующего анализа методом RFLP, а именно: продукты RFLP представляли собой для 181946G фрагменты размером 244 бп и для 181946 А – фрагменты размером 171 бп (рис. 2).

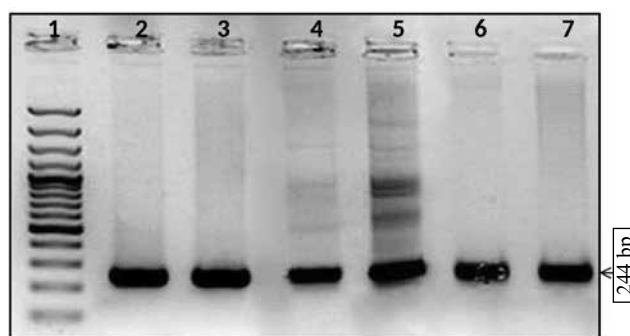


Рис. 1. ПЦР продуктов амплификации полиморфизма 181946G/A (D994D) (rs2293347) с использованием Biomaster HS Taq-PCR Color (2×) и Biomaster LR HS PCR (2×) в отдельных реакционных смесях: 1 – стандарты, 2 – контрольная ДНК, 3 – ДНК НМРЛ, 4 – контрольная ДНК с Biomaster HS Taq-PCR Color (2×), 5 – ДНК НМРЛ с Biomaster HS Taq-PCR Color (2×), 6 – контрольная ДНК с Biomaster LR HS PCR (2×), 7 – ДНК НМРЛ с Biomaster LR HS PCR (2×)

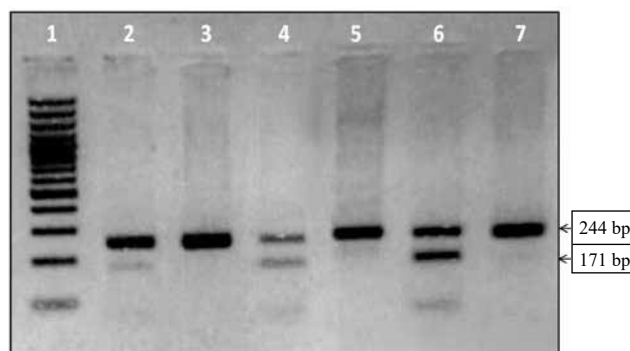


Рис. 2. Продукты PCR-RFLP для полиморфизма 181946G/A (D994D) (rs2293347) с Biomaster HS Taq-PCR Color (2x) и Biomaster LR HS PCR (2x) в отдельных реакционных смесях: lane 1 – стандарты, lane 2 – контрольная ДНК, lane 3 – ДНК НМРЛ, lane 4 – контрольная ДНК с Biomaster HS Taq-PCR Color (2x), lane 5 – ДНК НМРЛ with Biomaster HS Taq-PCR Color (2x), lane 6 – контрольная ДНК с Biomaster LR HS PCR (2x), lane 7 – ДНК НМРЛ with Biomaster LR HS PCR (2x)

Biomaster LR HS PCR 2× протестировали для -191 C/A, была выявлена соответствующая ПЦР амплификация (рис. 3). Biomaster HS Taq-PCR Color 2× не позволял получить желаемые продукты ПЦР размером 197 бп (рис. 3). Вместо этого в агарозном геле было видно множество смазанных и дополнительных полос размером больше ожидаемого. Поскольку при использовании Biomaster HS Taq-PCR Color 2× амплификации не было, мы проводили RFLP-анализ только для продуктов, полученных с помощью Biomaster LR HS PCR 2× kit, и визуализировали фрагмент 191 бп, который соответствует образцам ДНК с гомозиготой дикого типа (-191GG) (рис. 4).

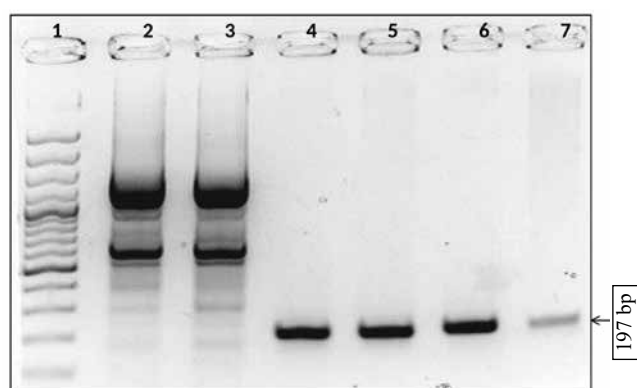


Рис. 3. Продукты ПЦР для полиморфизмов -191C/A (rs712830) and for -216G/T (rs712829) с Biomaster HS Taq-PCR Color (2x) и Biomaster LR HS PCR (2x) в отдельных реакционных смесях: lane 1 – стандарты, lane 2 – контрольная ДНК с Biomaster HS Taq-PCR Color (2x), lane 3 – ДНК НМРЛ с Biomaster HS Taq-PCR Color (2x), lane 4 – контрольная ДНК с Biomaster LR HS PCR (2x), lane 5 – ДНК НМРЛ с Biomaster LR HS PCR (2x), lane 6 – контрольная ДНК, lane 7 – ДНК НМРЛ

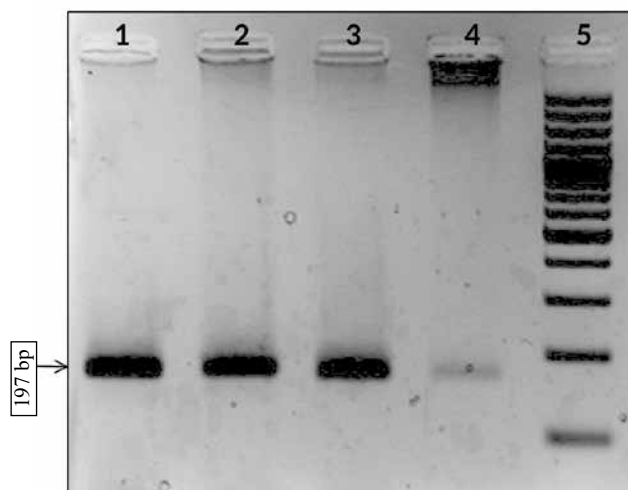


Рис. 4. Продукты PCR-RFLP для полиморфизма -191C/A (rs712830) с реакционной смесью Biomaster LR HS PCR (2x): lane 1 – контрольная ДНК с Biomaster LR HS PCR (2x), lane 2 – ДНК НМРЛ с Biomaster LR HS PCR (2x), lane 3 – контрольная ДНК, lane 4 – ДНК НМРЛ, lane 5 – стандарты

Продукты, получающиеся в результате PCR-RFLP для полиморфизма -16G/T (rs712829) с использованием реакционной смеси Biomaster LR HS, показаны на рис. 5.

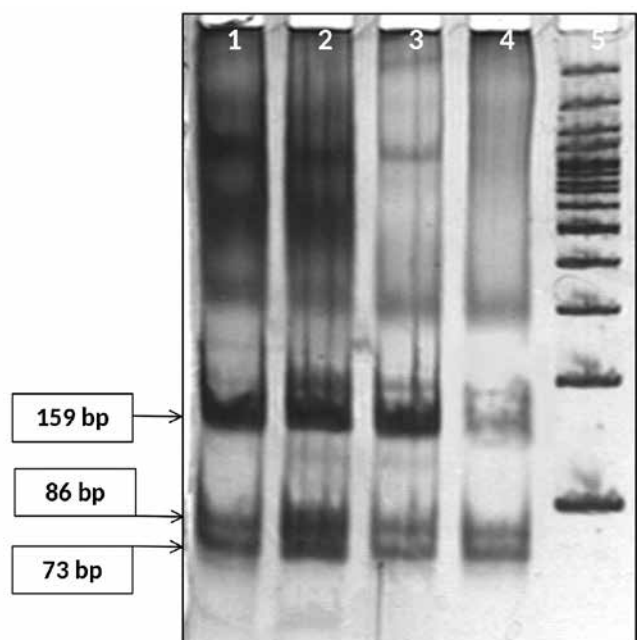


Рис. 5. Продукты PCR-RFLP для полиморфизма -16G/T (rs712829) с реакционной смесью Biomaster LR HS PCR (2x): lane 1 – контрольная ДНК с Biomaster LR HS PCR (2x), lane 2 – ДНК НМРЛ с Biomaster LR HS PCR (2x), lane 3 – контрольная ДНК, lane 4 – ДНК НМРЛ, lane 5 – стандарты

ОБСУЖДЕНИЕ

Общепринятый протокол ПЦР является основой широкого спектра биологических экспериментов, включая исследование EGFR, однако в каждом конкретном случае необходимо учитывать и соблюдать специфические условия реакции. Несмотря на то, что этот процесс может потребовать значительного времени и финансовых затрат, начиная с дизайна праймеров, подбора материалов, реагентов, реакционных смесей, протокола и температурного профиля амплификации и т.д., включая стратегию выявления и устранения неполадок, оптимизация методики ПЦР неизбежна, особенно, когда нужно амплифицировать GC-богатые участки [3, 5, 10]. Эти участки с высоким содержанием GC-пар образуют вторичные структуры и проявляют резистентность к денатурации, что приводит к неправильному прикреплению праймеров.

Было предпринято несколько попыток решить эти проблемы, включая модификацию праймеров или температурных условий [11], использование различных добавок [7, 9]. Обычно используются усиливающие реагенты для увеличения выхода и специфичности реакции на таких сложных ДНК матрицах [6, 8, 11–13]. Ранее мы подобрали подходящую концентрацию матрицы ДНК, температурные условия и оптимальную концентрацию $MgCl_2$ для амплификации EGFR SNPs в промоторных участках, содержащих до 75,45% GC [3, 5], и протестировали эффекты различных добавок, увеличивающих специфичность ПЦР [7, 9].

В настоящем исследовании мы описываем преимущества использования наборов Biomaster, поскольку они минимизируют риск контаминации, так как включают все реагенты и добавки, необходимые для проведения ПЦР, в одной реакционной смеси. Кроме того, уменьшается время приготовления базовой реакционной смеси. Наши результаты показывают, что наборы Biomaster обеспечивают более успешную реакцию ПЦР по сравнению с ПЦР в отсутствие этих наборов. В состав набора Biomaster LR HS PCR 2× входит комбинация HS-Taq и Pfu ДНК-полимераз со стабилизаторами ДНК-полимераз и соответствующими добавками, помогающими проведению реакции ПЦР. Он даже содержит 0,2% of Tween 20, который, как было показано [14], уменьшает количество неспецифических полос. Производителем было предложено при необходимости добавлять несколько больше DMSO, для которого также ранее подтверждена важная роль в данной реакции. Буферы для ПЦР, используемые для приготовления реакционной смеси, обычно содержат $MgCl_2$, тогда как буфер Biomaster LR HS PCR 2× – $MgSO_4$, что вероятно увеличивает полимеразную активность [8].

Этот набор подходит для протяженных, сложных участков и для GC-богатых фрагментов. И здесь мы показываем, что ожидаемые продукты PCR-RFLP для -191C>A из образцов рака легкого визуализируются при гель-электрофорезе (см. рис. 3, 4). Это даже не длинный фрагмент ПЦР (размером 244 bp). Для 181946 G/A адекватно работал как этот набор, так и Biomaster HS Taq-PCR Color 2× (см. рис. 1, 2).

Biomaster HS Taq-PCR Color 2× используют для общепринятой ПЦР и для матриц длиной до 5 kbp. Он уже содержит красители, поэтому нет необходимости в загрузке соответствующего буфера при электрофорезе. Благодаря высокой плотности, реакционная смесь легче проникает в лунку агарозного геля. Этот набор не подходит для -191C>A, поскольку не выявлено ожидаемых продуктов ПЦР (см. рис. 3).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в настоящем исследовании мы показали, что Biomaster HS Taq-PCR Color 2× и Biomaster LR HS PCR 2× эффективны для амплификации 181946 G/A, локализованного в интроне гена *EGFR*. Кроме того, *EGFR* SNP -191C/A, локализованный в промоторном участке с крайне высоким содержанием GC-пар, успешно амплифицировался с помощью Biomaster LR HS PCR 2×.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Liu W., Innocenti F., Wu M.H., Desai A.A., Dolan M.E., Cook E.H. et al. A functional common polymorphism in a Sp1 recognition site of the epidermal growth factor receptor gene promoter. *Cancer Res.* 2005;65(1):46–53. PMID: 15665278.
2. Nomura M., Shigematsu H., Li L., Suzuki M., Takahashi T., Estess P. et al. Polymorphisms, mutations, and amplification of the *egfr* gene in non-small cell lung cancers. *PLoS Med.* 2007;4(4):e125. DOI: 10.1371/journal.pmed.0040125.
3. Obradović J., Djordjević N., Tošić N., Mrdjanović J., Stanković B., Stanić J. et al. Frequencies of EGFR single nucleotide polymorphisms in non-small cell lung cancer patients and healthy individuals in the Republic of Serbia: a preliminary study. *Tumor Biol.* 2016;37(8):10479–10486. DOI: 10.1007/s13277-016-4930-4.
4. Ma F., Sun T., Shi Y., Yu D., Tan W., Yang M. et al. Polymorphisms of EGFR predict clinical outcome in advanced non-small-cell lung cancer patients treated with gefitinib. *Lung Cancer.* 2009;66(1):114–119. DOI: 10.1016/j.lungcan.2008.12.025.
5. Obradovic J., Jurisic V., Tosic N., Mrdjanovic J., Perin B., Pavlovic S. et al. Optimization of PCR conditions for amplification of GC-Rich EGFR promoter sequence. *J. Clin. Lab. Anal.* 2013;27(6):487–493. DOI: 10.1002/jcla.21632.
6. Hubé F., Reverdiau P., Iochmann S., Gruel Y. Improved PCR method for amplification of GC-rich DNA sequences. *Mol. Biotechnol.* 2005;31(1):81–84. DOI: 10.1385/MB:31:1:081.
7. Jensen M.A., Fukushima M., Davis R.W. DMSO and betaine greatly improve amplification of GC-rich constructs in de novo synthesis. *PLoS One.* 2010;5(6):e11024. DOI: 10.1371/journal.pone.0011024.
8. Strien J., Sanft J., Mall G. Enhancement of PCR Amplification of moderate GC-containing and highly GC-rich DNA Sequences. *Mol. Biotechnol.* 2013;54(3):1048–1054. DOI: 10.1007/s12033-013-9660-x.
9. Jurišić V., Obradović J., Tošić N., Pavlović S., Kulić M., Djordjević N. Effects of DMSO, glycerol, betaine and their combinations in detecting single nucleotide polymorphisms of epidermal growth factor receptor (EGFR) gene promoter sequence in non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2016;128:275–279. DOI: 10.1016/j.jpba.2016.05.010.
10. Lorenz T.C. Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *J. Vis. Exp.* 2012;(63):e3998. DOI: 10.3791/3998.
11. Sahdev S., Saini S., Tiwari P., Saxena S., Singh Saini K. Amplification of GC-rich genes by following a combination strategy of primer design, enhancers and modified PCR cycle conditions. *Mol. Cell Probes.* 2007;21(4):303–307. DOI: 10.1016/j.mcp.2007.03.004.
12. Naz S., Fatima A. Amplification of GC-rich DNA for high-throughput family based genetic studies. *Mol. Biotechnol.* 2013;53(3):345–350. DOI: 10.1007/s12033-012-9559-y.
13. Wei M., Deng J., Feng K., Yu B., Chen Y. Universal method facilitating the amplification of extremely GC-rich DNA fragments from genomic DNA. *Anal. Chem.* 2010;82(14):6303–6307. DOI: 10.1021/ac100797t.
14. Bachmann B., Luke W., Hunsmann G. Improvement of PCR amplified DNA sequencing with the aid of detergents. *Nucleic Acids Res.* 1990;18(5):1309. DOI: 10.1093/nar/18.5.1309.

Вклад авторов

Юришич В. – разработка концепции и дизайна статьи, пробоподготовка, сбор материала, выполнение биохимического раздела исследований; анализ литературы; анализ и интерпретация данных; написание и оформление текста рукописи. Обрадович Дж. – пробоподготовка, выполнение биохимического раздела исследований. Павлович С. – выполнение биохимического раздела исследования. Тошич Н. – выполнение раздела лучевых исследований. Гуляева Л.Ф. – сбор материала. Герштейн Е.С. – перевод статьи; участие в формировании концепции статьи. Кушлинский Н.Е. – содержательное научное редактирование, согласование финальной версии рукописи.

Информация об авторах

Юришич Владимир – д-р мед. наук, профессор, Крагуевацкий университет, факультет медицинских наук, г. Крагуевац, Республика Сербия, juriscvladimir@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-6525-128X>

Обрадович Ясмينا – д-р биол. наук, науч. сотрудник, отдел естественных наук, Институт информационных технологий, Крагуевацкий университет, г. Крагуевац, Республика Сербия, jasmينا.m.obradovic@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-8853-6525>

Тошич Наташа – д-р биол. наук, науч. сотрудник в области биологии, Институт молекулярной генетики и геномной инженерии, Белградский университет, г. Белград, Республика Сербия, natasa.tosic@imgge.bg.ac.rs, <https://orcid.org/0000-0002-1293-6215>

Павлович Соня – д-р биол. наук, профессор, Институт молекулярной генетики и геномной инженерии, Белградский университет, г. Белград, Сербия, sonya@sezampro.rs, <https://orcid.org/0000-0002-2915-1641>

Гуляева Людмила Федоровна – д-р биол. наук, профессор, вед. науч. сотрудник, ФИЦ ФТМ, г. Новосибирск, lfgulyaeva@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-7693-3777>

Герштейн Елена Сергеевна – д-р мед. наук, профессор, вед. науч. сотрудник, лаборатория клиничко-диагностической консультативно-диагностического центра, НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, г. Москва, esgershtein@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-3321-801X>

Кушлинский Николай Евгеньевич – д-р мед. наук, профессор, академик РАН, науч. руководитель лаборатории клиничко-диагностической консультативно-диагностического центра, НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, г. Москва, biochimia@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3898-4127>

(✉) **Юришич Владимир**, juriscvladimir@gmail.com

Поступила в редакцию 05.11.2024;
одобрена после рецензирования 22.11.2024;
принята к публикации 28.11.2024