

ВИКОРИСТАННЯ ДИФЕРЕНЦІЙНОГО ЛІЗИСУ ПРИ ВИДІЛЕННІ ДНК ДЛЯ ПІДТВЕРДЖЕННЯ ТРАНСФІКОВАНОСТІ СПЕРМІЇВ

**А. К. ПОЧЕРНЯЄВ¹, П. В. ДЕНИСЮК², М. О. ІЛЬЧЕНКО², С. Ф. ЛОБЧЕНКО²,
К. Ф. ПОЧЕРНЯЄВ²**

¹Харківський науково-дослідний експертно-криміналістичний центр МВС України (Харків, Україна)

²Інститут свинарства і АПВ НААН (Полтава, Україна)

<https://orcid.org/0000-0001-9520-4492> – А. К. Почерняєв

<https://orcid.org/0000-0003-4493-8044> – П. В. Денисюк

<https://orcid.org/0000-0001-8422-2230> – М. О. Ільченко

<https://orcid.org/0000-0001-9469-6202> – С. Ф. Лобченко

<https://orcid.org/0000-0001-9973-6429> – К. Ф. Почерняєв

k.f.pochernyaev@gmail.com

У статті наведено спосіб підтвердження трансфікованості сперміїв плазмідною ДНК, яка полягає у використанні диференційного лізису при виділенні ДНК соматичних клітин та сперміїв, подібний до методу, що використовують у криміналістиці при дослідженні статевих злочинів. Можливість використання способу перевірено експериментально. Пропонується в біотехнологічних дослідженнях по трансгенезу для зниження витрат часу і коштів використовувати підтвердження трансфекції сперматозоїдів.

Ключові слова: *pET-28c*, ендоцитоз, інтерналізація, ПЛР, плазмідна ДНК, свині, спермії, трансфекція

USE OF DIFFERENTIAL LYSIS FOR DNA ISOLATION TO CONFIRM SPERM TRANSFECTION

A. K. Pochernyaev¹, P. V. Denysiuk², M. O. Ichenko², S. F. Lobchenko², K. F. Pochernyaev²

¹Kharkiv Scientific Research Forensic Center of the Ministry of Internal Affairs of Ukraine (Kharkiv, Ukraine)

²Institute of Pig Breeding and AIP NAAS (Poltava, Ukraine)

In the article it is presented a method for confirming the transfection of sperm with plasmid DNA, which consists in the use of differential lysis for DNA isolation of somatic cells and spermatozoa, similar to the method used in forensic science in the study of sexual crimes. The possibility of using the method has been verified experimentally. It is proposed in biotechnological research on transgenesis to use the confirmation of sperm transfection in order to reduce the time and cost.

Keywords: *pET-28c*, endocytosis, internalization, PCR, plasmid DNA, pigs, sperm, transfection

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОГО ЛИЗИСА ПРИ ВЫДЕЛЕНИИ ДНК ДЛЯ ПОДТВЕРЖДЕНИЯ ТРАНСФЕКЦИИ СПЕРМИЕВ

А. К. Почерняев¹, П. В. Денисюк², М. А. Ильченко², С. Ф. Лобченко², К. Ф. Почерняев²

¹Харьковский научно-исследовательский экспертно-криминалистический центр МВД Украины (Харьков, Украина)

²Институт свиноводства и АПП НААН (Полтава, Украина)

В статье представлен метод подтверждения трансфекции сперматозоидов плазмидной ДНК, заключающийся в использовании дифференциального лизиса при выделении ДНК со-

матических клеток и сперматозоидов, аналогичного методу, применяемому в судебной медицине при расследовании преступлений на сексуальной почве. Возможность использования метода проверена экспериментально. Предлагается в биотехнологических исследованиях по трансгенезу для снижения затрат времени и средств использовать подтверждение трансфекции сперматозоидов.

Ключевые слова: pET-28с, эндоцитоз, интернализация, ПЦР, плазмидная ДНК, свиньи, сперма, трансфекция

Вступ. На відміну від клітин мікроорганізмів, для яких перенос генетичного матеріалу між особинами є ефективним і звичайним процесом, клітини вищих багатоклітинних тварин мають цілу низку захисних механізмів, що перешкоджають проникненню в них чужорідних молекул ДНК і РНК, що в першу чергу пов'язано із захистом від вірусів.

Захоплення клітинами нуклеїнових кислот у вільній формі (тобто за відсутності трансфекційних агентів – в англійській літературі позначається термінами "naked" або "free") в цілому вважається малоефективним, що обумовлено уявленнями про властивості клітинної мембрани і самих нуклеїнових кислот [1].

Поверхня еукаріотів має загальний негативний заряд завдяки вмісту в мембрані фосфатидилсерина, гліколіпідів і глікопротеїнів. Внаслідок цього виникає електростатичне відштовхування між клітинною мембраною і молекулою ДНК, що має негативно заряджений цукрофосфатний остів, що знижує ефективність зв'язування ДНК з клітинами [2]. Транспорт плазмідної ДНК (пДНК) також ускладнений у зв'язку з її відносно великим розміром, жорсткою просторовою структурою і невисокою рухливістю в біологічних рідинах.

Довгий час вважали, що олігонуклеотиди і пДНК не проникають через мембрани еукаріотичних клітин. Однак перші експерименти з клітинними культурами, а пізніше і у дослідях *in vivo* показали, що при додаванні до клітин ДНК за відсутності будь-яких трансфекційних агентів здатна проявляти специфічну біологічну активність, впливаючи на функції клітинних РНК і ДНК або викликаючи експресію перенесених ними генів (у разі плазмідних конструкцій), що опосередковано побічно свідчить про попадання цих ДНК всередину клітин. Незважаючи на активні дослідження в області фармакокінетики і біологічної активності нуклеїнових кислот, досі немає єдиної думки щодо питання про механізми їх проникнення через мембрани клітин. Залежно від використаної експериментальної моделі дослідники часто приходять до істотно різних висновків щодо переважання того чи іншого механізму інтерналізації ДНК клітинами. Навіть в разі використання незаряджених аналогів олігонуклеотидів, молекули ДНК мають занадто великий розмір, щоб долати клітинну мембрану шляхом пасивної дифузії [3].

Це призвело до припущення, що олігонуклеотиди і довгі послідовності проникають до клітини шляхом ендоцитозу – процесу поглинання клітинами об'єктів навколишнього середовища шляхом адсорбції їх мембраною з подальшим випинанням її всередину клітини з утворенням везикул, в яких захоплені ззовні об'єкти проходять подальшу утилізацію. Серед механізмів, які можуть брати участь в інтерналізації пДНК клітинами, різними дослідницькими групами називалися практично всі відомі типи ендоцитозу [4, 5].

Незважаючи на певні успіхи, створення трансгенних свиней залишається тривалим і малоефективним процесом.

Одним з ключових моментів трансфекції генеративних клітин свині є встановлення події інтерналізації чужорідної ДНК клітинами. Методи, що наразі використовують для встановлення події інтерналізації чужорідної ДНК клітинами, не враховують можливість присутності чужорідної ДНК на поверхні спермій, навіть після відмивання від культурального середовища. З огляду на це, метою даної роботи було розробити спосіб підтвердження трансфікованості спермій плазмідною ДНК.

Матеріали та методи дослідження. Спермії відмивали чотири рази за допомогою розбавника ГХЦС. Трансфекцію сперміїв виконували у 0,6 мл поліпропіленових пробірках з кришкою в об'ємі 50 мкл суспензії відмитих від білків сперміїв у ГХЦС з концентрацією сперміїв 100 млн/мл. До 50 мкл суспензії відмитих від білків сперміїв додавали по 10 мкл кільцевої форми плазмиди pET-28с (Novagen, Франція). Спермії інкубували в термостаті за умов 37,7°C протягом двох годин. Інкубовані спермії зберігали за умов -20°C.

Для виділення ДНК 60 мкл суспензії відмитих від білків сперміїв з плазмідною рЕТ-28с переносили до 1,5 мл поліпропіленової пробірки з кришкою та центрифугували 5 хв. за умов 12 тис. об. Хв., 35 мкл надосадової рідини переносили в чисту 1,5 мл пробірку, залишивши на дні приблизно 25 мкл рідини з осадом.

Виділення ДНК з надосадової рідини: У 1,5 мл пробірку, що містила 35 мкл надосадової рідини, додавали 2 мкл Протеїнази К (20 мг/мл) та 5% водної суспензії Chelex-100 до кінцевого об'єму 100 мкл. Вміст пробірки перемішували на вортексі та інкубували в твердотільному термостаті 30 хв. за умов +56°C та 8 хв. за умов +96°C. Надосадову рідину, що містить ДНК плазмиди pET-28с, переносили до чистої 0,6 мл пробірки з кришкою та зберігали за умов -20°C.

Виділення ДНК з осаду: До осаду додавали 100 мкл ТЕ-буферу та 2 мкл Протеїнази К (20 мг/мл) і витримували 1,5 год. за умов +56°C. Після 5 хв. центрифугування за умов 12 тис. об. хв. видаляли надосадову рідину, до осаду додавали 100 мкл ТЕ-буферу. Процедуру відмивання ТЕ-буфером повторювали двічі. До очищеного осаду додавали 7 мкл дітіотрейтолу (ДТТ), 2 мкл Протеїнази К (20 мг/мл) та 5% водної суспензії Chelex-100 до кінцевого об'єму 100 мкл. Вміст пробірки перемішували на вортексі та інкубували у твердотільному термостаті 30 хв. за умов +56°C та 8 хв. за умов +96°C. Надосадову рідину, що містить ДНК сперміїв кнур, переносили до чистої 0,6 мл пробірки з кришкою та зберігали за умов -20°C.

Ампліфікацію проводили на програмованому термостаті ТЕРЦИК-2 (ДНК-Технологии, РФ). Олігонуклеотидні праймери для ампліфікації ДНК pET-28с мали наступну структуру: T7 promoter – TAATACGACTCACTATAGGG, T7 terminator – CGCTGAGCAATAACTAGC. Ця пара олігонуклеотидних праймерів дозволяє отримувати продукт ПЛР розміром 314 п. н. Пробірки з продуктами ПЛР зберігали за умов -20°C.

Специфічність продуктів ПЛР перевіряли за допомогою 2% агарозного гель-електрофорезу у 1 × Трис-боратному електродному буфері (ТВЕ) упродовж 2 год. за сили струму 50 мА у горизонтальній електрофоретичній камері (Cleaver Scientific Ltd., UK). Як маркер молекулярної маси використовували ДНК плазмиди pUC19, гідролізованої ендонуклеазою Msp I. Після закінчення електрофорезу гель фарбували розчином бромистого етидію (10 мг/см³), а результати електрофорезу фотографували за допомогою системи гель-документації (Cleaver Scientific Ltd., UK).

Результати досліджень. Відмиті розбавником ГХЦС спермії мали рухливість 8 балів. Рухливість ресуспендованих у ГХЦС сперміїв оцінили у 6 балів.

Ампліфікація ДНК плазмиди pET-28с з надосадової рідини очікувано дозволила отримати продукт ПЛР розміром 314 п. н. і розглядалася нами як позитивний контроль. Розмір продукту ПЛР 314 п. н., що відповідав очікуваному з використанням олігонуклеотидних праймерів (T7promoter/T7terminator), слугував підтвердженням використання плазмиди pET-28с.

Ампліфікація ДНК плазмиди pET-28с, що була виділена зі сперміїв способом диференційного лізису, також дозволила отримати продукт ПЛР розміром 314 п. н. Таким чином, було отримано доказ того, що плазмідна ДНК проникає через мембрану всередину сперміїв.

Як відомо, основною перешкодою для «чужорідних» нуклеїнових кислот (тобто плазмід) під час трансфекції еукаріотичних клітин є їх здатність до неспецифічної або вродженої імунної системи (англ. *innate immune system*), яка визначається цитозольними ДНК-сенсорами. Цей захисний механізм клітини може значно впливати на ефективність як тимчасової, так і стабільної трансфекції.

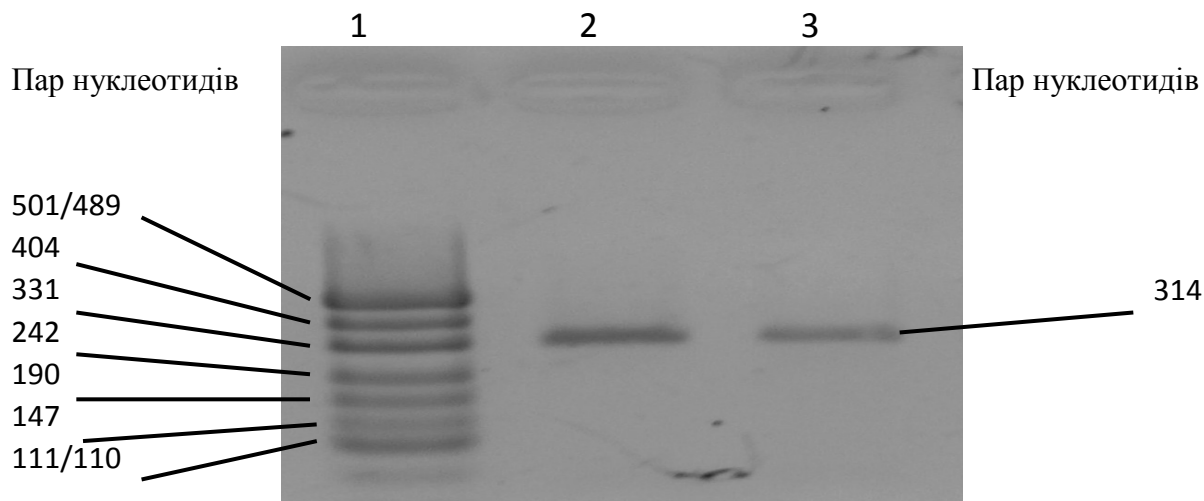


Рис. 1. Електрофоретичне розділення у 2% агарозному гелі продуктів ПЛР, отриманих з використанням олігонуклеотидних праймерів (T7 promoter/T7 terminator) та матричної ДНК: 1 – маркер молекулярної маси ДНК *pUC19/Msp I*; 2 – ДНК з надосадової рідини, де відбулася трансфекція спермійів; 3 – ДНК з осаду спермійів, оброблених протеїназою K, DTT та Chelex-100

Стабільна і тимчасова трансфекція розрізняються за своїм терміном впливу на клітину. При стабільній трансфекції плазмідна ДНК успішно інтегрується до геному клітини та передається наступним поколінням клітини. Однак при тимчасовій трансфекції генетичний матеріал потрапляє в клітину, але не інтегрується у клітинний геном. Таким чином, тимчасово трансфіковані клітини будуть експресувати чужорідну ДНК тільки протягом короткого періоду часу, а дочірні клітини її не успадкують [6].

Для подолання пригнічення вродженої імунної системи клітини використовують різні підсилювачі трансфекції, наприклад, GeneXplus, Lipofectamine® LTX і jetPRIME®.

Про перспективність використання різних методів трансфекції свідчить поява на ринку нових інноваційних підсилювачів трансфекції нуклеїнової кислоти. Так, компанія InvivoGen, яка є одним з лідерів виробництва PRR лігандів, клітинних ліній, селективних антибіотиків, антибактеріальних агентів, ад'ювантів вакцин, антитіл, таке інше, випустила підсилювач трансфекції нуклеїнової кислоти «NATE™». Його пропонують використовувати для підвищення ефективності як тимчасової, так і стабільної трансфекції. Фахівці InvivoGen стверджують, що використання «NATE™» забезпечує більш високий рівень вихід трансфекції навіть з плазмідами, що мають значний розмір (> 10 т. п. н.) [7].

З огляду на це, розроблення простого та надійного способу підтвердження трансфікованості спермійів плазмідною ДНК знову набуває актуальності.

Завдяки стандартизації процедур вилучення речових доказів на місці злочину, їх обробці, лабораторних протоколів, статистичних моделей і аналітичних методів, зокрема мікросателітів (STR), криміналістичні лабораторії генетичного аналізу людини є нині «золотим стандартом», якого генетичні лабораторії, що працюють у інших галузях, повинні досягти [8]. Як вважають А. Iyenga, S. Hadi (2014), подібність методів, що використовуються для аналізу та інтерпретації генетичних даних людини і тварин, прискорюють перенесення накопиченого досвіду від криміналістичної експертизи до генетичної експертизи тварин [9].

Оскільки, криміналістичні генетичні лабораторії постійно стикаються з потребами в обробці доказів ДНК в ході розслідувань сексуальних насильств, аналіз їх методів досліджень, вибір найбільш придатних та адаптація для підтвердження трансфікованості спермійів плазмідною ДНК має певний сенс.

У випадках сексуальних насильств докази, зібрані на місці злочину або у потерпілих, зазвичай містять суміш клітин, принаймні, від двох донорів. Виділення ДНК, для доказу зв'язку зразка з передбачуваним злочинцем, вимагає точної хімічної обробки кожного зразка з

метою відокремлення епітеліальних клітин від сперматозоїдів, з наступним руйнуванням клітинної мембрани спермія дітіотрейтолом. В даний час переважна більшість лабораторій використовують методи диференціального хімічного лізису, які вимагають тривалої інкубації і декількох ручних операцій [10].

Існують також інші двоетапні методи для диференціальної екстракції ДНК із сумішей сперматозоїдів і вагінальних епітеліальних клітин, наприклад, з використанням технології циклічної зміни тиску (англ. *Pressure cycling technology* – PCT) і лужного лізису. Як показали D. V. Nori et al. (2015), у контрольованих експериментах, в яких рівні кількості сперматозоїдів і жіночих епітеліальних клітин були додані до ватних тампонів, 5-хвилинна пульсація тиску в присутності 0,4 М NaOH дозволила виділити $104 \pm 6\%$ жіночої епітеліальної ДНК. Наступна 5-хвилинна обробка лугом при 95°C без тиску призвела до селективного вилучення $69 \pm 6\%$ ДНК сперматозоїдів. Розділення ДНК вагінального епітелію і сперматозоїдів було оптимізовано шляхом визначення концентрації гідроксиду натрію, температури і часу інкубації. Після стадій лужного лізису зразки нейтралізували 2 М трис (рН 7,5) і очищали сумішшю фенол-хлороформ-ізоаміловий спирт для подальшого аналізу. Загальний час обробки для видалення обох фракцій з тампона був менше 20 хв. STR-аналіз цих фракцій, отриманих в результаті обробки PCT і лужного лізису, дозволив отримати чисті профілі жіночої епітеліальної ДНК і ДНК чоловічої сперми (суміш жіночих і чоловічих клітин 1:1) і переважно чоловічі профілі для сумішей до 5:1 жіночих в чоловічі клітини. Завдяки скороченню часу і збільшенню кількості виділеної ДНК з ватних тампонів цей метод також може бути потенційно корисним для диференціального виділення [11].

Окрім того, вже існують і автоматизовані методи органічної диференціації сперматозоїдів і вагінальних епітеліальних клітин. Так, M. C. Goldstein et al. (2020) порівняли можливості ручного та автоматизованого методів. Кількість ДНК визначали за допомогою кількісної ПЛР з подальшою мультиплексною STR-ампліфікацією. Автоматичний метод був здатний ефективно розділяти клітини з виділенням ДНК у кількості, достатній для ампліфікації STR [12].

Аналіз різних методів виділення ДНК із сперми, які використовують у криміналістиці при дослідженні статевих злочинів за принципом ціна-якість, дозволив нам обрати за прототип метод K. Yoshida et al. (1995) [13]. Час, необхідний для виділення ДНК з використанням диференційного лізису з культурального середовища, поверхні сперматозоїда та вмісту головки сперматозоїда, залежить від кваліфікації персоналу та об'ємів досліджень і в середньому складає 5–6 годин. Для виділення ДНК з використанням диференційного лізису не потрібно складного обладнання та значних витрат на реактиви, але запліднення яйцеклітин спермою з підтвердженою подією трансфекції, дозволить заощадити на наступних етапах трансгенезу.

Висновки. Використання диференційного лізису спермів при виділенні ДНК дозволяє ефективно визначати подію потрапляння плазмідної ДНК до спермів. Серед передбачуваних механізмів інтерналізації плазмідної ДНК клітинами можуть бути практично всі відомі типи ендцитозу.

Вдячності. Проведення наукових досліджень виконано завдяки фінансовій підтримці Національної академії аграрних наук України, № ДР 0119U000437.

БІБЛІОГРАФІЯ

1. Zhou R., Geiger R. C., Dean D. A. Intracellular trafficking of nucleic acids. *Expert Opin Drug Deliv.* 2004. Vol. 1. (1). P. 127–140. DOI: <http://doi:10.1517/17425247.1.1.127>
2. Kotwicka M., Jendraszak M., Jedrzejczak P. Phosphatidylserine membrane translocation in human spermatozoa: topography in membrane domains and relation to cell vitality. *J. Membr. Biol.* 2011. Vol. 240. (3). P. 165–170. DOI: <http://doi:10.1007/s00232-011-9357-7>
3. Chaparian S., Abdulahnejad A., Rashidi F., Toghyani M., Gheisari A., Eghbalsaied S. Is passive transmission of non-viral vectors through artificial insemination of sperm-DNA mixtures sufficient for chicken transgenesis? *J. Reprod. Dev.* 2016. Vol. 62. (3). P. 265–270. DOI: <http://doi:10.1262/jrd.2015-176>

4. Grandinetti G., Reineke T. M. Exploring the mechanism of plasmid DNA nuclear internalization with polymer-based vehicles. *Mol. Pharm.* 2012. Vol. 9. (8). P. 2256–2267. DOI: <http://doi:10.1021/mp300142d>
5. Dolgova E. V., Potter E. A., Proskurina A. S., Minkevich A. M., Chernych E. R., Ostannin A. A., Efremov Y. R., Bayborodin S. I., Nikolin V. P., Popova N. A., Kolchanov N. A., Bogachev S. S. Properties of internalization factors contributing to the uptake of extracellular DNA into tumor-initiating stem cells of mouse Krebs-2 cell line. *Stem Cell Res. Ther.* 2016. Vol. 7. (1). P. 76. DOI: <http://doi:10.1186/s13287-016-0338-8>
6. Kim T. K., Eberwine J. H. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 2010. Vol. 397. (8). P. 3173–3178. DOI: <http://doi:10.1007/s00216-010-3821-6>.
7. https://www.invivogen.com/nate?gclid=Cj0KCQjwPdQDBhCSARI-sAEUJ0hNLXf0Sf725eksJLEvKRjDXnddw6CID-gn2xMjp_XmfP9-0yZT3ihsaAkydEALw_wcB
8. Lynch M. God's signature: DNA profiling, the new gold standard in forensic science. *Endeavour.* 2003. Vol. 27. (2). P. 93–97. DOI: [http://doi:10.1016/s0160-9327\(03\)00068-1](http://doi:10.1016/s0160-9327(03)00068-1).
9. Iyengar A., Hadi S. Use of non-human DNA analysis in forensic science: a mini review. *Med. Sci. Law.* 2014. Vol. 54. (1). P. 41–50. DOI: <http://doi:10.1177/0025802413487522>
10. Clark C., Turiello R., Cotton R., Landers J. P. Analytical approaches to differential extraction for sexual assault evidence. *Anal. Chim. Acta.* 2021. Vol. 1141. P. 230–245. DOI: <http://doi:10.1016/j.aca.2020.07.059>
11. Nori D. V., McCord B. R. The application of alkaline lysis and pressure cycling technology in the differential extraction of DNA from sperm and epithelial cells recovered from cotton swabs. *Anal. Bioanal. Chem.* 2015. Vol. 407. (23). P. 6975–84. DOI: <http://doi:10.1007/s00216-015-8737-8>
12. Goldstein M. C., Cox J. O., Seman L. B., Cruz T. D. Improved resolution of mixed STR profiles using a fully automated differential cell lysis/DNA extraction method. *Forensic Sciences Research.* 2020. Vol. 5. (2). P. 106–112. DOI: <http://doi:10.1080/20961790.2019.1646479>
13. Yoshida K., Sekiguchi K., Mizuno N., Kasai K., Sakai I., Sato H., Seta S. The modified method of 2-step differential extraction of sperm and vaginal epithelial-cell DNA from vaginal fluid mixed with semen. *Forensic Science International.* 1995. Vol. 72. P. 25–33. DOI: [https://doi.org/10.1016/0379-0738\(94\)01668-U](https://doi.org/10.1016/0379-0738(94)01668-U)

REFERENCES

1. Zhou, R., R. C. Geiger, and D. A. Dean. 2004. Intracellular trafficking of nucleic acids. *Expert Opin Drug Deliv.* 1(1):127–40. DOI: <http://doi:10.1517/17425247.1.1.127> (in English).
2. Kotwicka, M., M. Jendraszak, and P. Jedrzejczak. 2011. Phosphatidylserine membrane translocation in human spermatozoa: topography in membrane domains and relation to cell vitality. *J. Membr Biol.* 240(3):165–70. DOI: <http://doi:10.1007/s00232-011-9357-7> (in English).
3. Chaparian, S., A. Abdulahnejad, F. Rashidi, M. Toghyani, A. Gheisari, and S. Eghbalsaid. 2016. Is passive transmission of non-viral vectors through artificial insemination of sperm-DNA mixtures sufficient for chicken transgenesis? *J. Reprod Dev.* 62(3):265–70. DOI: <http://doi:10.1262/jrd.2015-176> (in English).
4. Grandinetti, G., and T. M. Reineke. 2012. Exploring the mechanism of plasmid DNA nuclear internalization with polymer-based vehicles. *Mol. Pharm.* 9(8):2256–67. DOI: <http://doi:10.1021/mp300142d> (in English).
5. Dolgova, E. V., E. A. Potter, A. S. Proskurina, A. M. Minkevich, E. R. Chernych, A. A. Ostannin, Y. R. Efremov, S. I. Bayborodin, V. P. Nikolin, N. A. Popova, N. A. Kolchanov, and S. S. Bogachev. 2016. Properties of internalization factors contributing to the uptake of extracellular DNA into tumor-initiating stem cells of mouse Krebs-2 cell line. *Stem Cell Res. Ther.* 7(1):76. DOI: <http://doi:10.1186/s13287-016-0338-8> (in English).

6. Kim, T. K., and J. H. Eberwine. 2010. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 397(8):3173–3178. DOI: <http://doi:10.1007/s00216-010-3821-6> (in English).
7. https://www.invivogen.com/nate?gclid=Cj0KCQjwpcdqDBhCSARI-sAEUJ0hNLXf0Sf725eksJLEvKRjDXnddw6CID-gn2xMjp_XmfP9-0yZT3ihsaAkydEALw_wcB
8. Lynch, M. 2003. God's signature: DNA profiling, the new gold standard in forensic science. *Endeavour*. 27(2):93–97. DOI: [http://doi:10.1016/s0160-9327\(03\)00068-1](http://doi:10.1016/s0160-9327(03)00068-1) (in English).
9. Iyengar, A., and S. Hadi. 2014. Use of non-human DNA analysis in forensic science: a mini review. *Med. Sci. Law*. 54(1):41–50. DOI: <http://doi:10.1177/0025802413487522> (in English).
10. Clark, C., R. Turiello, R. Cotton, and J. P. Landers. 2021. Analytical approaches to differential extraction for sexual assault evidence. *Anal. Chim. Acta*. 1141:230–245. DOI: <http://doi:10.1016/j.aca.2020.07.059> (in English).
11. Nori, D. V., and B. R. McCord. 2015. The application of alkaline lysis and pressure cycling technology in the differential extraction of DNA from sperm and epithelial cells recovered from cotton swabs. *Anal. Bioanal. Chem*. 407(23):6975–84. DOI: <http://doi:10.1007/s00216-015-8737-8> (in English).
12. Goldstein, M. C., J. O. Cox, L. B. Seman, and T. D. Cruz. 2020. Improved resolution of mixed STR profiles using a fully automated differential cell lysis/DNA extraction method. *Forensic Sciences Research*. 5(2):106–112. DOI: <http://doi:10.1080/20961790.2019.1646479> (in English).
13. Yoshida, K., K. Sekiguchi, N. Mizuno, K. Kasai, I. Sakai, H. Sato, and S. Seta. 1995. The modified method of 2-step differential extraction of sperm and vaginal epithelial-cell DNA from vaginal fluid mixed with semen. *Forensic Science International*. 72:25–33. DOI: [https://doi.org/10.1016/0379-0738\(94\)01668-U](https://doi.org/10.1016/0379-0738(94)01668-U) (in English).

Одержано редколегією 25.03.2021 р.
Прийнято до друку 26.04.2021 р.