

ШУТЬ Т. С.¹, КОСОЛАПОВ І. А.²

¹ Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України»,

Україна, 04123, м. Київ, вул. Байди-Вишневецького 2а, ORCID: 0009-0008-3849-599X

² Київський національний університет ім. Т. Шевченка, Навчально-науковий центр «Інститут біології та медицини»,

Україна, 02000, м. Київ, просп. Академіка Глушкова, 2, ORCID: 0009-0004-7169-0894

✉ timonmone@gmail.com, kosolapov.ivan@gmail.com

ПОРІВНЯННЯ МЕТОДІВ ВИДІЛЕННЯ ДНК У ГРИБІВ ВІДДІЛУ ASCOMYCOTA

Мета. Порівняти методи виділення ДНК із грибів відділу Ascomycota. Застосовувались протоколи з використанням SDS (додецилсульфату натрію), СТАВ (цетилтриметиламонію броміду), які були модифіковані під даний тип організмів та комерційний набір NeoPrep¹⁰⁰ DNA Magnet_Plant (NEOGENE, Україна). **Методи.** Виділення ДНК з міцелію грибів за допомогою трьох вище згаданих протоколів. Ампліфікація фрагментів генів β -тубуліна із використанням полімеразної ланцюгової реакції із специфічними праймерами. Розділення ампліконів у 1,5 %-агарозному гелі у присутності бромистого етидію. **Результати.** Адаптовано різні протоколи виділення ДНК для грибів відділу Ascomycota. Визначено концентрацію та якість виділеної ДНК, які варіювали у залежності від застосованого методу. Встановлено як різні методи виділення ДНК можуть впливати на полімеразну ланцюгову реакцію. **Висновки.** Встановлено, що SDS-метод виявився найбільш ефективним та оптимальним для виділення ДНК з грибів відділу Ascomycota. Найдовшим за тривалістю виділення був СТАВ-метод, а найкоротшим – виділення ДНК за допомогою набору NeoPrep¹⁰⁰ DNA Magnet_Plant (NEOGENE, Україна).

Ключові слова: Ascomycota, виділення ДНК, SDS, СТАВ, магнітний сорбент, спектрофотометрія.

Гриби відіграють важливу роль у житті людини завдяки їхній екологічній, медичній та харчовій цінності. Вони використовуються у кулінарії, у фармацевтиці для отримання антибіотиків, а також у галузі біотехнології для виробництва ферментів і органічних кислот. Крім того, гриби беруть участь у розкладанні органічних речовин і біоремедіації, допомагаючи очищувати довкілля від забруднень [1].

Відділ Ascomycota – найпоширеніший відділ грибів, який нараховує понад 93000 відомих видів. Вони представлені у різних екосистемах, із яких переважна більшість веде сапрофітний спосіб життя, частина із них є патогенами рослин та тварин, а інша частина утворює симбіотичні зв'язки із рослинами, зокрема лишайники та мікоризи [2]. Аскомікотові гриби характеризуються наявністю септованого міцелію та специфічними органами статевого спороношення – сумками (асками), які зазвичай містять по 8 аскоспор [2].

Гриби є складним об'єктом для виділення ДНК, бо у них є складні клітинні стінки, які містять товсті шари із бета-глюканів, ліпідів, протейнів та хітину. Тому, щоб виділити ДНК, треба зруйнувати клітинну стінку. Усі методи руйнування можна звести до 3 груп: фізичні, хімічні та ферментні. Із фізичних методів поширені перетирання тканини з використанням скляних кульок, обробка звуком (соніфікація) чи мікрохвилями. Хімічні методи включають у себе обробку детергентами, наприклад, додецилсульфатом натрію (SDS) чи цетилтриметиламонію бромідом (СТАВ) тощо. Ферментні методи полягають у процесах додавання ензимів, які руйнують клітинну стінку гриба [3].

SDS-метод базується на використанні лізуючого буферного розчину на основі SDS та застосовується на рослинних, тваринних об'єктах та мікроорганізмах [4–6]. SDS є детергентом, що руйнує клітинні мембрани, а для того, щоб відділити білки, у розчин додають солі у високій концентрації (висолювання). Далі ДНК осаджуються етанолом чи ізопропанолом [6]. Однак у даного методу є головний недолік – залишки буферу після виділення можуть інгібувати полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) [5]. Для деяких груп організмів з метою

© ШУТЬ Т. С., КОСОЛАПОВ І. А.

збільшення кількості виділеної ДНК метод можуть модифікувати [4, 5].

СТАВ-метод базується на використанні іншого детергенту: цетилтриметиламонію броміду (СТАВ). Даний метод дозволяє швидко та недорого виділяти значну кількість ДНК із невеликого зразка. Недоліком є труднощі у виділенні ДНК великих розмірів у деяких організмів [7]. Цей метод був розрахований для виділення ДНК із рослин, але його можна адаптувати і для інших груп організмів [11]. Для поліпшення результатів виділення ДНК також використовують модифікації СТАВ-методу [7, 8].

Метод виділення ДНК за допомогою магнітного сорбенту базується на взаємодії молекул ДНК із магнітними наночастинками [9]. Єдиної думки стосовно природи взаємодії магнітних наночастинок з ДНК поки не існує. Можливо, це наслідок дії електростатичних взаємодій між феромагнітними наночастинками та фосфатними групами у ланцюгах ДНК. Тим не менше, наночастинки Fe_3O_4 без чітко описаних властивостей поверхні були успішно застосовані для виділення ДНК. У якості наночастинок також можна використовувати сполуки кобальту та нікелю. Такі частинки є фізично та хімічно стабільними при виділенні ДНК [9]. Механізм дії цієї технології ґрунтується на застосуванні спеціального лізуючого розчину, який забезпечує руйнування клітин, розчинення клітинних залишків і денатурацію нуклеаз. У середовищі лізуючого та промивного буферних розчинів відбувається адсорбція ДНК на спеціальному магнітному сорбенті. Далі, згідно з протоколом, ДНК легко очищується від білків, солей та інших домішок за допомогою промиваючого розчину. На завершальному етапі виділення ДНК здійснюється її десорбція в елюційний буферний розчин. Отримана ДНК придатна для подальшого використання без додаткового очищення або обробки [10].

Якість та концентрацію ДНК після виділення можна оцінити за допомогою флуориметрії, спектрофотометрії та електрофорезу в агарозному або акриламідному гелях [6].

Слід зазначити, що поки немає єдиного протоколу виділення ДНК, який би міг бути застосований на всіх типах об'єктів [3]. Наприклад, у дослідженні Xia et al., 2019 [4] при виділенні ДНК із соєвих бобів *Glycine max* (L.) Merr. порівняно такі протоколи: SDS, СТАВ, DP305, та DNeasy Plant Mini Kit. У результаті SDS-метод забезпечив отримання найбільшої кількості

ДНК під час виділення [4]. У дослідженні Galliano et al, 2021 на грибних об'єктах отримано схожий результат: виділення за допомогою SDS-методу показало високий вихід ДНК з можливістю її використання для проведення ПЛР. Виділення ДНК шляхом кип'ятіння зразків показало найкращі результати щодо кількості виділеної ДНК, але ампліфікації у подальшому не відбувалось [11].

Матеріали і методи

Для досліджень були відібрані 4 види грибів із відділу Ascomycota: *Ophycordyceps sinensis* (Berk.), *Cordyceps militaris* (L.), *Cordyceps sp.*, *Morchella esculenta* (L.).

Міцелій грибів вирощували на глюкозо-пептон-дріжджовому середовищі при температурі 25°C, після чого була відібрана 7-добова міцеліальна маса. Із кожного виду відібрали по 6 зразків міцелію по 0,1 г, які були розфасовані у пробірки та заморожені. Під час дослідження із кожного виду гриба виділяли ДНК двічі кожним способом (SDS [12], СТАВ та набором NeoPrep¹⁰⁰ DNA Magnet_Plant (NEOGENE, Україна)). Нумерацію зразків наведено у таблиці.

Якість та кількість ДНК визначали спектрофотометрично за допомогою BIOPHOTOMETER «NanoDrop Lite» (THERMO SCIENTIFIC, США).

Для визначення впливу метода виділення ДНК на ПЛР ампліфікацію проводили з праймерами до генів β -тубуліну грибів (<https://lutzonilab.org/beta-tubulin/>) (TUBb-F: 5'-CCACCTGTCTCCGTTTCCCCG-3' TUBb-R: 5'-TCTGGATGTTGTTGGGAATCC-3'). Полімеразну ланцюгову реакцію здійснювали в ампліфікаторі SimpliAmp Thermal Cycler (ThermoFisher, США), використовуючи реакційну суміш об'ємом 10 мкл (5x ПЛР-буфер із сульфатом амонію, 2,5 ммоль MgCl_2 , 40 нг ДНК, 1 μM кожного з праймерів, 0,2 ммоль кожного dNTPs, 0,5 од. Taq-полімерази («Fermentas», Литва)). Ампліфікацію проводили за наступним протоколом: початкова денатурація (95°C) 5 хв, 40 циклів ампліфікації (денатурація – 95°C 30 с, гібридація праймерів – 55°C 30 с, елонгація – 72°C 1 хв), кінцева елонгація – 72°C 8 хв, утримання – 4°C.

Отримані продукти ампліфікації розділяли за допомогою електрофорезу у 1,5 % агарозному гелі у TAE-буферному розчині у присутності бромистого етидію [13]. Наявність цільових фрагментів свідчила про успішність ПЛР [14].

Таблиця. Концентрація та співвідношення (260/280) у виділених зразках ДНК

Номер зразка	Вид	Метод	Проба	Концентрація ДНК, ng/μl	A (260/280)
1	<i>C. militaris</i>	SDS	1	262,0	2,03
2			2	587,6	2,10
3		CTAB	1	22,2	1,97
4			2	16,5	1,85
5		Магнітний	1	20,2	2,6
6			2	111,9	7,57
7	<i>O. sinensis</i>	SDS	1	348,1	2,11
8			2	678,6	2,13
9		CTAB	1	24,4	2,11
10			2	0,4	1,55
11		Магнітний	1	25,5	3,27
12			2	90,0	8,11
13	<i>M. esculenta</i>	SDS	1	783,7	1,94
14			2	94,7	1,70
15		CTAB	1	58,0	1,82
16			2	87,2	2,02
17		Магнітний	1	27,7	3,48
18			2	26,4	3,88
19	<i>Cordyceps sp.</i>	SDS	1	3067,6	1,16
20			2	2851,2	3,70
21		CTAB	1	58,9	1,65
22			2	43,3	1,69
23		Магнітний	1	13,6	3,33
24			2	20,5	4,95

SDS-метод. Зразки у пробірці були заморожені у рідкому азоті та ретельно перетерті товкачем. Для виділення ДНК застосовано протокол Pluzhnyk et al. 2025 [12]. До перетертих зразків додавали 750 μl SDS-буферного розчину (1 % SDS, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 50 mM Tris (pH = 8,0) та 10 mM 2-меркаптоетанол, який додавали безпосередньо перед виділенням). Далі суміш перемішували та ставили на 40 хвилин у водяну баню при температурі 65°C.

Додавали 200 μl 3,0 М ацетату натрію, перемішували на вортексі та ставили інкубуватись на 20 хв на льоду. Далі суспензію центрифугували 14500 об/хв протягом 10 хвилин. Надосадову рідину об'ємом 600 μl переносили у чисту пробірку та додавали той же об'єм охолодженого ізопропанолу, перемішували на вортексі, центрифугували протягом 2 хв 14500 об/хв та видаляли надосадову рідину. До осаду додавали 450 μl охолодженого 80 % етилового спирту, перемішували на вортексі, ставили центрифугуватись на 2 хв зі швидкістю 14500 об/хв. Надосадову рідину видаляли, а процедуру очищення повторювали. Наприкінці здійснювали переосадження ДНК, щоб додатково очистити ДНК від залишків детергентів для запобігання інгібуван-

ня ПЛР. Для цього до ДНК додавали 40 мкл суміші 3,0 М ацетат натрію-етилловий спирт (1:25), ставили на ніч при температурі -20°C. Далі розчин центрифугували 30 хв при 14500 об/хв та видаляли надосадову рідину. Осад двічі промивали охолодженим 80 % етанолом по 500 μl із подальшим центрифугуванням по 5 хв 14500 об/хв. Пробірки з ДНК сушили за умов кімнатної температури, далі осад ДНК розчиняли у 40 μl дистильованої води та ставили на зберігання у холодильник при температурі 2-8°C [15].

CTAB-метод. Для виділення ДНК було використано частину раніше запропонованого протоколу [16]. Зразки (100 mg міцелію) заморожували у рідкому азоті та перетирали товкачем. До суміші додавали 600 μl лізуючого буферного розчину CTAB (CTAB 2 %, NaCl 1,4M, Tris 0,1M, EDTA 20mM (pH = 8,0) + 7μl 2-меркаптоетанолу, який додають безпосередньо перед використанням). Перемішували та ставили у термостат на 3 години при температурі 65°C, епізодично помішуючи (10 разів за весь час інкубування). Далі отриману суміш залишали на ніч у термостаті при температурі 40°C.

На наступний день суміш центрифугували 14000 об/хв 10 хвилин. Далі супернатант переносили у нову пробірку, куди додавали 700 μ л суміші хлороформ-ізопропіловий спирт (24:1). Після цього суміш ретельно перемішували та інкубували 5 хвилин при температурі 18°C. Далі суміш центрифугували 14000 об/хв 30 хв при тій самій температурі. Супернатант переносили у іншу пробірку та додавали 700 μ л суміші хлороформ-ізопропіловий спирт (24:1). Після чого знову ретельно перемішували шляхом перевертання, а далі інкубували 5 хвилин при кімнатній температурі. У подальшому суміш знову центрифугували 14000 об/хв протягом 15 хв.

Преципітація. Переносили верхню фазу, не торкаючись білого кільця, в іншу пробірку. Додавали по 1/3 від об'єму супернатанта 3М NaCl та охолоджений ізопропанол. Після цього знову перемішували шляхом перевертання і центрифугували при 14000 об/хв 30 хвилин. Супернатант обережно зливали, а до осаду додавали 750 μ л 70 % охолодженого розчину етанолу, перемішували та ставили центрифугуватися 5 хв 14000 об/хв. Супернатант видаляли, а ДНК переосаджували за тим же протоколом, як і у попередньому випадку (застосовували суміш 3,0 М ацетат натрію-етиловий спирт (1:25)). Розчини ДНК зберігали у холодильнику за температури 2–8°C.

Виділення за допомогою магнітного сорбенту (набору NeoPrep¹⁰⁰ DNA Magnet_Plant (NEOGENE, Україна)). Зразки були заморожені у рідкому азоті та перетерті товкачем. Далі додавали 800 μ л лізуючого розчину, після чого вміст пробірки перемішували та ставили інкубуватися у термостат при температурі 65°C на 40 хв. У подальшому суміш центрифугували при 3500 об/хв протягом 30 с, відбирали 300 μ л супернатанту та переносили у нову пробірку. Додавали 20 μ л попередньо ресуспендованого сорбенту NeoSorb (R) та перемішували вручну 10 хв шляхом перевертання. Далі пробірки з суспензією розміщували на 15 секунд у магнітному штативі, щоб на стінках зібрати всі магнітні наночастинки. Надосадову рідину видаляли та додавали 400 μ л лізуючого і 1 мл буферного розчинів. У подальшому вміст пробірки перемішували на вортексі. Пробірки знову розташовували у магнітному штативі на 15 с, після чого акуратно видаляли надосадову рідину. Далі додавали 1 мл буферного розчину, перемішували та ставили на магнітний штатив. Видаляли надосадову рідину. Далі знову повторювали цей

крок. Осад підсушували 5 хв у термостаті при температурі 65°C, додавали 75 μ л буферу для розчинення ДНК та ретельно перемішували на вортексі. Далі переносили 60 μ л буферу із ДНК у чисту пробірку. Отримані розчини ДНК зберігали у холодильнику за умов 2–8°C.

Результати та обговорення

Отримані концентрації ДНК представлені у таблиці, де показано, що SDS-метод забезпечує найбільший вихід ДНК. Встановлено, що за умов застосування описаних методів виділення ДНК для всіх видів, окрім *M. esculenta* (зразки 13–18) відбувалася ампліфікація фрагментів генів β -тубуліна. Однак використання СТАВ-методу для виділення ДНК показало гірші результати у *C. militaris* та *O. sinensis*. Лише в одному із зразків (№3) чітко візуалізовувався цільовий фрагмент, який був менш яскравим, ніж у зразках, виділених іншими методами, тоді як у зразках №4 та №9 цільового фрагменту взагалі не спостерігалось. Питання про можливість інгібування ПЛР домішками, які можуть залишатися у ДНК під час використання СТАВ-методу, теж розглядаються.

Щодо *M. esculenta*, то у жодному випадку після проведення ПЛР не було виявлено відповідних ампліконів, незважаючи на наявність достатньої кількості виділеної ДНК та непоганих характеристиках її якості. Можливо, це можна пояснити тим, що застосовані праймери не були достатньо комплементарними до цільових ділянок генів β -тубуліна саме у цього виду.

Також варто зауважити, що за часом виділення ДНК кожним із запропонованих методів теж є різниця. Найдовше відбувалось виділення ДНК за допомогою СТАВ-методу – до 3 днів (включно із переосадженням); SDS-метод – потребував до 2 днів. Виділення за допомогою магнітного сорбенту виконувалось за 1 день (рис.).

Висновки

У межах проведених досліджень порівняно три методи виділення ДНК (з використанням SDS, СТАВ та комерційного набору NeoPrep¹⁰⁰ DNA Magnet_Plant, NEOGENE, Україна) з грибів відділу Ascomycota (*C. militaris*, *O. sinensis*, *M. esculenta*, *Cordyceps. sp.*). Отримані результати свідчать, що всі перевірені методи можуть бути використані для виділення ДНК з подальшим її використанням для проведення ПЛР. Найефективнішим виявився SDS-метод, де спо-

стерігається найбільша кількість отриманої ДНК високої якості. За часом, який необхідний для проведення екстракції ДНК, найдовше триває виділення із застосуванням СТАВ-методу, а найменше – виділення за допомогою набору

NeoPrep¹⁰⁰ DNA Magnet_Plant (NEOGENE, Україна). Отже, враховуючи отримані результати, SDS-метод можна вважати найбільш оптимальним для виділення ДНК з грибів відділу Ascomycota.

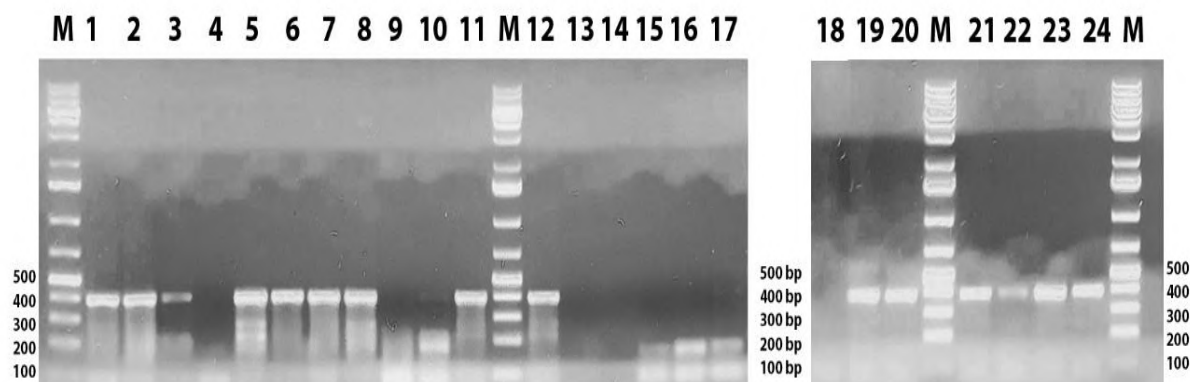


Рис. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК з праймерами до генів β -тубуліна представників відділу Ascomycota. Нумерація відповідає порядковому номеру зразків, зазначеному у таблиці.

References

- Roth M. G., Westrick N. M., Baldwin T. T. Fungal biotechnology: From yesterday to tomorrow. *Front. fungal biol.* 2023. Vol. 4. P. 1135263. <https://doi.org/10.3389/ffunb.2023.1135263>.
- Senanayake I. C., et al. Predicting global numbers of teleomorphic ascomycetes. *Fungal Diversity*. 2022. Vol. 114. P. 237–278. <https://doi.org/10.1007/s13225-022-00498-w>.
- Chauhan B. M., Kunjadiya K. M., Parekh S. N. Comparison of extraction techniques for isolation of fungal DNA. *IJRASET*. 2022. Vol. 10 (1). P. 1234–1240. <https://doi.org/10.22214/ijraset.2022.41542>.
- Xia Y., Chen F., Du Y., Liu C., Bu G., Xin Y., Liu B. A modified SDS-based DNA extraction method from raw soybean. *Bioscience Reports*. 2019. Vol. 39 (2). P. BSR20182271. <https://doi.org/10.1042/BSR20182271>.
- Sakai H. A DNA extraction method with SDS from single nematodes for direct application to PCR amplification. *J. Nematol.* 2010. Vol. 40 (1). P. 13–14. <https://doi.org/10.3725/jjn.40.13>.
- Brito O. A., Santos F. A., Yafawi T. T., Saraiva C. R., Silva R. O., Leandro L. M., Aquino P. E., Junior D. L., Meandro M. K. Comparing protocols of DNA extraction from *Escherichia coli*: Analysis of purity and concentration by gel electrophoresis. *BJ-BABS*. 2022. Vol. 3 (2). P. 133–144. <https://doi.org/10.47419/bjbabs.v3i02.123>.
- Schenk J. J., Becklund L. E., Carey S. J., Fabre P. P. What is the “modified” CTAB protocol? Characterizing modifications to the CTAB DNA extraction protocol. *APPS*. 2023. Vol. 11 (3). P. e11517. <https://doi.org/10.1002/aps3.11517>.
- Kouakou J.-L., Gonedelé-Bi S., Assamoi J.-B., N'Guetta S.-P. A. Optimization of the Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) DNA extraction protocol using forest elephant dung samples. *MethodsX*. 2022. Vol. 9. P. 101867. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2022.101867>.
- Szymczyk A., Drozd M., Kamińska A., Matczuk M., Trzaskowski M., Mazurkiewicz-Pawlicka M., Ziółkowski R., Malinowska E. Comparative evaluation of different surface coatings of Fe₃O₄-based magnetic nano sorbent for applications in nucleic acids extraction. *Int. J. Mol. Sci.* 2022. Vol. 23 (16). P. 8860. <https://doi.org/10.3390/ijms23168860>.
- Shetty P. J. The evolution of DNA extraction methods. *Am. J. Biomed. Res.* 2020. Vol. 8 (1). P. 45–50. <https://doi.org/10.34297/AJBSR.2020.08.001234>.
- Galliano I., Daprà V., Zaniol E., Alliaudi C., Graziano E., Montanari P., Calvi C., Bergallo M. Comparison of methods for isolating fungal DNA. *Pract. Lab. Med.* 2021. Vol. 25. P. e00221. <https://doi.org/10.1016/j.plabm.2021.e00221>.
- Pluzhnyk A. V., Petlova V. R., Dzhan V. V. Rapid and Efficient Method for DNA Extraction from Fungi of the Genus *Morchella* Dill. Ex Pers”. *Mikrobiologichnyi Zhurnal*. 2025. Vol. 87 (1). <https://doi.org/10.15407/>.
- Sambrook J., David W. R. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, 2001. Vol. 2. 763. P. 17.
- Benbouza H., Jean-Marie J., Jean-Pierre B. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2006. Vol. 10 (2). P. 77–81.
- Al-Saad L. A., Al-Zaalan A. R. Short Communication: Evaluating the efficiency of ethanol precipitation of gDNA and PCR product. *Basrah J. Agric. Sci.* 2019. Vol. 32. P. 276–281.
- Conlon B. H., Schmidt S., Poulsen M., Shik J. Z. Orthogonal protocols for DNA extraction from filamentous fungi. *STAR Protocols*. 2022. Vol. 3 (1). P. 101126. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2022.101126>.

SHUT T. S.¹, KOSOLAPOV I. A.²

¹ Institute of Food Biotechnology and Genomics, Nat. Acad. Sci. of Ukraine, Ukraine, 04123, Kyiv, Baidy-Vyshnevetskoho str., 2a

² Educational and Scientific Center "Institute of Biology and Medicine", Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ukraine, 02000, Kyiv, Akademika Hlushkova Ave., 2

COMPARISON OF DNA EXTRACTION METHODS IN ASCOMYCOTA FUNGI

Aim. To compare DNA extraction methods from fungi of the Ascomycota. Protocols using SDS (sodium dodecyl sulfate), CTAB (cetyltrimethylammonium bromide), which were modified for this type of organisms, and the commercial kit NeoPrep¹⁰⁰ DNA Magnet_Plant (NEOGENE, Ukraine) were applied. **Methods.** Isolation of DNA from fungal mycelium using the three protocols mentioned above. Amplification of β -tubulin gene fragments using polymerase chain reaction with specific primers. Separation of amplicons in a 1.5 % agarose gel in the presence of ethidium bromide. **Results.** Various DNA extraction protocols were adapted for fungi of the Ascomycota. The concentration and quality of the extracted DNA were determined, which varied depending on the method used. It was established how different DNA extraction methods can affect polymerase chain reaction. **Conclusions.** It was found that the SDS method was the most effective and optimal for DNA isolation from fungi of the Ascomycota. The longest isolation time was the CTAB method, and the shortest was DNA isolation using the NeoPrep¹⁰⁰ DNA Magnet_Plant kit (NEOGENE, Ukraine).

Keywords: Ascomycota, DNA extraction, SDS, CTAB, magnetic sorbent, spectrophotometry.