

## ОПТИМИЗАЦИЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ИЗ КРОВИ И ЕЕ КОМПОНЕНТОВ: КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ И КАЧЕСТВЕННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

*Лямцева А. К., Костюк С. А., Жевнеронок И. В., Полуян О. С.,  
Руденкова Т. В., Глинкина Т. В.*

*Государственное учреждение образования  
«Белорусская медицинская академия последипломного образования»,  
г. Минск, Республика Беларусь*

**Реферат.** Качество ДНК зависит как от качества биологического материала, из которого она была выделена, так и от способа выделения. К настоящему времени разработано большое количество методик экстракции ДНК, и выбор конкретного метода осуществляют на основе таких факторов, как высокий выход нуклеиновой кислоты, быстрота метода, высокая степень чистоты и др. Оптимизация выделения ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени дает возможность повысить репрезентативность и достоверность полученных результатов.

**Ключевые слова:** выделение ДНК, полимеразная цепная реакция, цельная кровь, оптимизация.

**Введение.** ПЦР признана быстрым, чувствительным и специфичным инструментом молекулярной диагностики для анализа нуклеиновых кислот. Однако чувствительность и кинетика ПЦР-анализа может быть значительно снижена с таким биологическим материалом, как кровь, из-за ингибирующих ПЦР компонентов [1].

Выбор подходящего метода для быстрого, безопасного и бюджетного выделения чистой ДНК является необходимым условием для проведения исследований. В связи с этим выбор подходящего биологического материала зависит от многих факторов. Помимо чистоты и выхода, также учитываются инвазивность метода сбора образцов, наличие специализированного оборудования, обученного персонала, а также риск инфекций. Тем не менее цельная кровь остается основным источником ДНК для диагностических целей. К настоящему времени разработано большое количество методик выделения ДНК, основанных на различных принципах, таких как фенол-хлороформная экстракция,

магнитные частицы, хроматографические методы, сорбция на различных носителях [2].

Одним из наиболее распространенных в лабораторной диагностике методов выделения и очистки ДНК является сорбция нуклеиновых кислот на поверхности частиц.

**Цель работы** — поиск оптимального метода выделения ДНК из крови и ее компонентов для использования метода сорбционной экстракции.

**Материалы и методы.** Исследования были проведены на базе научно-исследовательской лаборатории ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования». При оптимизации методики выделения использовали 15 образцов крови волонтеров. В качестве исследуемых объектов использовали: цельную кровь, клеточную массу крови, лейкоцитарную фракцию после центрифугирования цельной крови, лейкоцитарную фракцию после лизирующего буфера цельной крови/клеточной массы крови, мононуклеарные клетки периферической крови.

**Цельная кровь.** Взятие крови в объеме 9 мл производили с антикоагулянтом ЭДТА из локтевой вены (пробирки вакуумные «МиниМед», РФ). Полученную кровь делили на аликвоты по 2 мл для проведения дальнейших исследований.

**Клеточная масса крови.** Для получения клеточной массы крови 1,5 мл цельной крови центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин при комнатной температуре. Полученную плазму переносили в сухие чистые пробирки, оставшийся клеточный осадок использовали для дальнейшего исследования.

**Лейкоцитарная фракция после центрифугирования цельной крови.** В чистую сухую пробирку вносили 1,5 мл цельной крови и центрифугировали при 1000 об/мин в течение 10 мин (центрифуга MPW-55, MPW Med. Instruments, Польша). Верхний слой плазмы (500–600 мкл) с лейкоцитами переносили в другую чистую сухую пробирку и повторно центрифугировали при 8000 об/мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость удаляли, оставляя 300 мкл плазмы над осадком клеток; осадок клеток и оставленную надосадочную жидкость использовали для исследования.

**Лейкоцитарная фракция после добавления лизирующего буфера к цельной крови/клеточной массе крови.** К 100 мкл цельной крови/клеточной массы крови добавляли 300 мкл лизирующего буфера (VersaLyse Lysing Solution, Beckman Coulter), инкубировали при комнатной температуре 10 мин. Добавляли 1 мл физиологического раствора, перемешивали, центрифугировали 5 мин при 1400 об/мин. После удаления надосадочной жидкости добавляли 1 мл физиологического раствора, перемешивали, центрифугировали 5 мин при 1400 об/мин. Надосадочную жидкость удалили, к осадку, содержащему лейкоцитарную фракцию, добавляли 300 мкл физиологического раствора и использовали для дальнейшего исследования.

**Мононуклеарные клетки периферической крови.** В пробирку вносили раствор фиколлурографина в количестве 1 мл, сверху аккуратно наслаивали 2 мл цельной крови, центрифугировали 30 мин 1500 об/мин при комнатной температуре. На границе раздела фаз отбирали кольцо мононуклеарных клеток и переносили в новую пробирку. Клетки подвергали 3-кратному отмыванию в 1,5 мл физиологического раствора с режимом центрифугирования 1500 об/мин в течение 15 мин. К осадку выделенных клеток добавляли 500 мкл физиологического раствора и использовали для дальнейшего исследования.

В ходе оптимизации метода выделения ДНК из крови и ее компонентов были использованы следующие наборы реагентов: «АртДНК легкий» («АртБиоТех», Беларусь), «Экстракция-100» («ВекторБест», РФ) и «ДНК-сорб-В» («АмплиСенс», РФ). После выделения ДНК из образцов биологического материала с использованием различных наборов реагентов провели сравнение значений показателя  $A_{260/280}$  (определение чистоты препарата и концентрации ДНК), наличие амплификации гена  $\beta$ -глобина человека (значение  $C_t$ , кривые плавления) и контроля экстракции внутреннего контрольного образца (ВКО). Качественное выявление проводили методом ПЦР в режиме реального времени с применением тест-систем «АртТест» (АртБиоТех, Беларусь). Амплификацию проводили на термоциклере Rotor-Gene-6000 (Corbett research, Австралия).

В состав реакционной смеси для амплификации участка гена  $\beta$ -глобина человека были включены:

forward-праймер —  
5'-GGCAGGTTGGTATCAAGGTTAC-3',  
reverse-праймер —  
5'-CCTAAGGGTGGGAAAATAGACC-3',  
зонд — 5'-ROX-  
ACTGGGCATGTGGAGACAGA-BHQ2-3'.

Состав смеси: 12,5 мкл «2X премикс для ПЦР-РВ» (Прайтех, Беларусь); 1,1 мкл смеси эквивалентных концентраций праймеров (прямого и обратного); 1,0 мкл интеркалирующего красителя ZUBR Green-1; 7,5 мкл воды и 3 мкл выделенной ДНК. Программа амплификации: 1 цикл: 94 °C — 5 мин; 35 циклов: 94 °C — 30 с, 55 °C — 30 с, 72 °C — 30 с; 1 цикл: 72 °C — 10 мин (Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000, Corbett Research, Австралия).

Все количественные данные имели непараметрическое распределение (проверка на нормальность проводилась с использованием критерия Колмогорова — Смирнова, показателя ассиметрии и эксцесса,  $W$ -критерия Шапиро — Уилка). Множественные межгрупповые сравнения независимых выборок проводили с помощью критерия Краскела — Уоллиса, парные сравнения независимых выборок по количественным характеристикам проводили с использованием  $U$ -критерия Манна — Уитни.

Для представления полученных данных использовали показатели медианы ( $Me$ ) и процентилей ( $Q_{25}/Q_{75}$ ). Различия считались статистически значимыми при уровне значимости ( $P$ ) менее 0,05.

**Результаты и их обсуждение.** *Цельная кровь.* При сравнительном анализе значений показателя

теля  $A_{260/280}$  с использованием критерия Краскела – Уоллиса выявлены статистически значимые отличия. При попарном сравнении достоверно более высокие значения показателя были

выявлены при использовании набора реагентов «ДНК-сорб-В» (1,67 (1,56 ± 1,67) по сравнению со значениями, полученными при использовании других наборов реагентов (таблица 1).

Таблица 1 — Значения показателей ДНК, выделенной из цельной крови с использованием трех наборов реагентов

Показатель	Наборы реагентов			Уровень значимости (P)
	1 «АртДНК легкий» (n = 15)	2 «Экстракция-100» (n = 15)	3 «ДНК-сорб-В» (n = 15)	
$A_{260/280}$	1,47 (1,36 ± 1,49)	1,44 (1,40 ± 1,45)	1,67 (1,56 ± 1,67)	0,03* $P_{1-2} = 0,75$ $P_{1-3} = 0,01\#$ $P_{2-3} = 0,04\#$
ВКО (Ct)	21,41 (20,48 ± 27,09)	16,07 (15,87 ± 16,4)	17,58 (16,82 ± 18,73)	0,08
β-глобин (Ct)	0 (0 ± 28,33)	20,83 (20,46 ± 21,54)	27,13 (25,75 ± 27,78)	0,14

\* Сравнение с помощью критерия Краскела – Уоллиса, различия статистически значимы ( $P < 0,05$ ).

# Сравнение с помощью критерия Манна – Уитни, различия статистически значимы ( $P < 0,05$ ).

По показателю амплификации гена β-глобина и ВКО не выявлено статистически значимых различий между полученными значениями для трех наборов реагентов.

*Клеточная масса крови.* При изучении показателей ДНК, выделенной из клеточной массы крови, было установлено статистически значимое увеличение показателя  $A_{260/280}$  с ис-

пользованием набора реагентов «ДНК-сорб-В» (1,80 (1,75 ± 1,86)) в сравнении с аналогичным показателем при использовании набора реагентов «Экстракция-100» (0,76 (0,64 ± 0,97)). Отношение  $A_{260/280}$  при использовании набора «ДНК-сорб-В» близкое к 1,8 и указывает на то, что ДНК обладает высокой чистотой. Полученные результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2 — Значения показателей ДНК, выделенной из клеточной массы крови с использованием трех наборов реагентов

Показатель	Наборы реагентов			Уровень значимости (P)
	1 «АртДНК легкий» (n = 15)	2 «Экстракция-100» (n = 15)	3 «ДНК-сорб-В» (n = 15)	
$A_{260/280}$	1,30 (1,30 ± 1,50)	0,76 (0,64 ± 0,97)	1,80 (1,75 ± 1,86)	0,03* $P_{1-2} = 0,25$ $P_{1-3} = 0,17$ $P_{2-3} = 0,01\#$
ВКО (Ct)	24,20 (20,27 ± 24,84)	0 (0 ± 17,25)	19,91 (19,37 ± 20,79)	0,03* $P_{1-2} = 0,05$ $P_{1-3} = 0,25$ $P_{2-3} = 0,02\#$
β-глобин (Ct)	29,32 (0 ± 30,48)	21,7 (0 ± 22,76)	26,9 (25,21 ± 27,08)	0,11

\* Сравнение с помощью критерия Краскела – Уоллиса, различия статистически значимы ( $P < 0,05$ ).

# Сравнение с помощью критерия Манна – Уитни, различия статистически значимы ( $P < 0,05$ ).

При сравнительном анализе значений показателя ВКО установлено достоверное увеличение значений при использовании набора для

выделения «ДНК-сорб-В» — 19,91 (19,37 ± 20,79) по сравнению с набором для выделения «Экстракция-100» (0 (0 ± 17,25),  $P = 0,02$ ).

В ходе проведенных исследований не выявлено достоверных различий между значениями  $St$  для гена  $\beta$ -глобина, полученными при амплификации ДНК, выделенной с использованием трех наборов реагентов.

*Лейкоцитарная фракция после центрифугирования цельной крови.* Значения показателя  $A_{260/280}$  не имели статистически значимых различий для ДНК, выделенной с использованием всех наборов реагентов (таблица 3).

Таблица 3 — Значения показателей ДНК, выделенной из лейкоцитарной фракции после центрифугирования цельной крови с использованием трех наборов реагентов

Показатель	Наборы реагентов			Уровень значимости ( $P$ )
	1	2	3	
	«АртДНК легкий» ( $n = 15$ )	«Экстракция-100» ( $n = 15$ )	«ДНК-сорб-В» ( $n = 15$ )	
$A_{260/280}$	1,06 (1,04 $\pm$ 1,21)	1,34 (1,32 $\pm$ 1,34)	1,30 (1,20 $\pm$ 1,85)	0,29
ВКО ( $St$ )	21,97 (21,37 $\pm$ 23,34)	16,08 (15,61 $\pm$ 16,66)	18,06 (17,78 $\pm$ 19,82)	0,002* $P_{1-2} = 0,01\#$ $P_{1-3} = 0,01\#$ $P_{2-3} = 0,01\#$
$\beta$ -глобин ( $St$ )	0 (0 $\pm$ 0)	24,17 (23,27 $\pm$ 26,15)	25,33 (24,54 $\pm$ 27,37)	0,01* $P_{1-2} = 0,01\#$ $P_{1-3} = 0,01\#$ $P_{2-3} = 0,35$

\* Сравнение с помощью критерия Краскела – Уоллиса, различия статистически значимы ( $P < 0,05$ ).

# Сравнение с помощью критерия Манна – Уитни, различия статистически значимы ( $P < 0,05$ ).

С применением статистического анализа (критерием Краскела – Уоллиса) были установлены достоверные различия значений показателя ВКО. При попарном сравнении достоверно более низкие значения данного показателя были выявлены при использовании набора реагентов «Экстракция-100» (16,08 (15,61  $\pm$  16,66) по сравнению с остальными наборами.

Анализ результатов, полученных в ходе определения значений показателя гена  $\beta$ -глобина из ДНК, выделенной из лейкоцитарной фракции, позволил установить достоверные различия по критерию Краскела – Уоллиса. При попарном сравнении значений  $St$  гена  $\beta$ -глобина были выявлены достоверные различия между 1–2 и 1–3, тогда как между 2 и 3 группами различия отсутствовали.

*Лейкоцитарная фракция после добавления лизирующего буфера к цельной крови/клеточной массе крови.* Для ДНК, выделенной из лейкоцитарной фракции после добавления лизирующего буфера к цельной крови, по показателю  $A_{260/280}$  достоверных отличий с использованием методов статистического анализа выявлено не было (таблица 4). Образцы ДНК, полученные с использованием наборов реагентов «АртДНК легкий» (1,75 (1,74  $\pm$  1,75)) и «ДНК-сорб-В» (1,82 (1,81  $\pm$  1,82)), имели коэффициенты поглощения  $A_{260/280}$ , наиболее близкие к 1,8, что указывает на то, что они были наименее загрязнены белками и другими ингибиторами. По показателю амплификации гена  $\beta$ -глобина и ВКО также не выявлено статистически значимых различий между полученными значениями для трех наборов реагентов.

Таблица 4 — Значения показателей ДНК, выделенной из лейкоцитарной фракции после добавления лизирующего буфера к цельной крови с использованием трех наборов реагентов

Показатель	Наборы реагентов			Уровень значимости ( $P$ )
	1	2	3	
	«АртДНК легкий» ( $n = 15$ )	«Экстракция-100» ( $n = 15$ )	«ДНК-сорб-В» ( $n = 15$ )	
$A_{260/280}$	1,75 (1,74 $\pm$ 1,75)	1,45 (1,44 $\pm$ 1,45)	1,82 (1,81 $\pm$ 1,82)	0,10
ВКО ( $St$ )	15,24 (14,63 $\pm$ 15,84)	15,9 (15,83 $\pm$ 15,98)	17,95 (17,69 $\pm$ 18,22)	0,18

Окончание табл. 4

Показатель	Наборы реагентов			Уровень значимости ( <i>P</i> )
	1 «АртДНК легкий» ( <i>n</i> = 15)	2 «Экстракция-100» ( <i>n</i> = 15)	3 «ДНК-сорб-В» ( <i>n</i> = 15)	
β-глобин (Сг)	27,49 (27,35 ± 27,62)	26,72 (26,57 ± 26,87)	27,15 (27,14 ± 27,16)	0,10

Для ДНК, полученной из лейкоцитарной фракции после добавления лизирующего буфера к клеточной массе крови, при сравнении

показателя  $A_{260/280}$  достоверных отличий в значениях выявлено не было. Полученные результаты представлены в таблице 5.

Таблица 5 — Значения показателей ДНК, выделенной из лейкоцитарной фракции после добавления лизирующего буфера к клеточной массе крови с использованием трех наборов реагентов

Показатель	Наборы реагентов			Уровень значимости ( <i>P</i> )
	1 «АртДНК легкий» ( <i>n</i> = 15)	2 «Экстракция-100» ( <i>n</i> = 15)	3 «ДНК-сорб-В» ( <i>n</i> = 15)	
$A_{260/280}$	1,42 (1,28 ± 1,57)	1,33 (1,27 ± 1,34)	0,94 (0,81 ± 1,12)	0,07
ВКО (Сг)	18,98 (18,73 ± 19,17)	18,47 (18,18 ± 18,73)	20,72 (20,434 ± 20,81)	0,01* $P_{1-2} = 0,08$ $P_{1-3} = 0,02^{\#}$ $P_{2-3} = 0,02^{\#}$
β-глобин (Сг)	28,75 (28,21 ± 28,89)	27,99 (27,87 ± 28,12)	27,75 (26,61 ± 28,48)	0,61

\* Сравнение с помощью критерия Краскела – Уоллиса, различия статистически значимы ( $P < 0,05$ ).

# Сравнение с помощью критерия Манна – Уитни, различия статистически значимы ( $P < 0,05$ ).

В ходе анализа данных показателя ВКО установлены статистически значимые различия значений по критерию Краскела – Уоллиса. При попарном сравнении критерием Манна – Уитни установлено достоверное увеличение значений данного показателя для ДНК, выделенной с помощью набора реагентов «ДНК-сорб-В» (20,72 (20,434 ± 20,81)) в сравнении со значениями наборов реагентов «Экстракция-100» (18,47 (18,18 ± 18,73)) и «АртДНК легкий» (18,98 (18,73 ± 19,17)).

Аmplификация последовательности гена β-глобина в образцах лейкоцитарной фракции после лизирующего буфера к клеточной массе крови была успешной во всех образцах, статистически значимых различий не выявлено.

Мононуклеарные клетки периферической крови. В отношении мононуклеарных клеток периферической крови не выявлено статистически значимых различий по показателю  $A_{260/280}$  (таблица 6).

Таблица 6 — Значения показателей ДНК, выделенной из мононуклеарных клеток периферической крови с использованием трех наборов реагентов

Показатель	Наборы реагентов			Уровень значимости ( <i>P</i> )
	1 «АртДНК легкий» ( <i>n</i> = 15)	2 «Экстракция-100» ( <i>n</i> = 15)	3 «ДНК-сорб-В» ( <i>n</i> = 15)	
$A_{260/280}$	1,43 (1,39 ± 1,49)	0,95 (0,93 ± 2,01)	1,40 (1,37 ± 1,40)	0,68
ВКО (Сг)	18,77 (18,71 ± 19,21)	19,23 (19,19 ± 19,41)	19,93 (19,76 ± 19,99)	0,02* $P_{1-2} = 0,12$ $P_{1-3} = 0,01^{\#}$ $P_{2-3} = 0,12$

Окончание табл. 6

Показатель	Наборы реагентов			Уровень значимости ( <i>P</i> )
	1	2	3	
	«АртДНК легкий» ( <i>n</i> = 15)	«Экстракция-100» ( <i>n</i> = 15)	«ДНК-сорб-В» ( <i>n</i> = 15)	
β-глобин (Сt)	20,57 (20,45 ± 20,95)	18,27 (18,15 ± 18,32)	19,74 (19,67 ± 20,04)	0,14

\* Сравнение с помощью критерия Краскела – Уоллиса, различия статистически значимы ( $P < 0,05$ ).

# Сравнение с помощью критерия Манна – Уитни, различия статистически значимы ( $P < 0,05$ ).

В ходе сравнительного анализа показателя ВКО выявлено достоверное увеличение значений для ДНК, выделенного набором «ДНК-сорб-В» (19,93 (19,76 ± 19,99)) в сравнении со значениями аналогичного показателя для ДНК, выделенного набором реагентов «АртДНК легкий» (18,77 (18,71 ± 19,21)), с уровнем значимости  $P = 0,01$ .

При сравнении показателя амплификации гена β-глобина достоверных отличий в значениях выявлено не было.

**Заключение.** На основании полученных данных для дальнейших экспериментов по выделению ДНК из крови и ее компонентов

в качестве биологического материала предпочтительно использовать лейкоцитарную фракцию после добавления лизирующего буфера к цельной крови с применением наборов реагентов «ДНК-сорб-В» и «АртДНК легкий». Как менее дорогостоящий метод с высоким выходом ДНК целесообразно использование клеточной массы крови с применением набора реагентов «ДНК-сорб-В». Следует отметить, что все исследованные наборы реагентов для выделения ДНК соответствуют своему целевому назначению и позволяют достаточно эффективно проводить экстракцию ДНК.

#### Список цитированных источников

1. Pre-PCR processing: strategies to generate PCR-compatible samples / P. Redström [et al.] // Mol. Biotechnol. — 2004. — Vol. 26, № 2. — P. 133–146. DOI: 10.1385/MB:26:2:133.

2. Evaluating genomic DNA extraction methods from human whole blood using endpoint and real-time PCR assays / L. Koshy [et al.] // Mol. Biol. Rep. — 2017. — Vol. 44, № 1. — P. 97–108. DOI: 10.1007/s11033-016-4085-9.

## Optimization of DNA and its components isolation from blood: quantitative and qualitative characteristics

*Lyamtseva A. K., Kostiuk S. A., Zhevneronok I. V., Poluyan O. S., Rudenkova T. V., Glinkina T. V.*

*State Educational Establishment “Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education”, Minsk, Republic of Belarus*

The quality of DNA depends both on the quality of the biological material from which it was isolated and on the method of isolation. To date, a large number of DNA extraction techniques have been developed, and the choice of a specific method is based on factors such as high nucleic acid yield, method speed, high purity, etc. Optimization of DNA extraction by real-time polymerase chain reaction (PCR) gives the opportunity to increase the representativeness and reliability of the results obtained.

**Keywords:** DNA extraction, polymerase chain reaction, whole blood, optimization.

*Поступила 10.06.2022*