XXI Российская научная конференция школьников «Открытие»

СЕКЦИЯ БИОЛОГИЯ

**Исследование эффективности различных методов выделения ДНК из биологических субстратов человека**

**Исследовательская работа**

Автор - **Фомичева Елизавета Алексеевна**,

обучающая 11 класса Средней школы

«Провинциальный колледж» г. Ярославля

Научный руководитель **- Фомичева Анна Николаевна**, кандидат биологических наук, учитель биологии Средней школы «Провинциальный колледж»

Ярославль, 2018

Оглавление

[Введение 3](#_Toc506239039)

[1. Основная часть 4](#_Toc506239040)

[1.1. Материалы и методы исследования 4](#_Toc506239041)

[1.2. Результаты исследования и их обсуждение 4](#_Toc506239042)

[2. Заключение 10](#_Toc506239044)

[2.1. Выводы 10](#_Toc506239045)

[Список литературы 11](#_Toc506239046)

Приложение……………………………………………………………………………………………..12

# Введение

Молекулярная биология — комплекс биологических наук, изучающих механизмы хранения, передачи и реализации генетической информации, строение и функции нерегулярных биополимеров (белков и нуклеиновых кислот).

Методы молекулярной биологии в настоящее время широко используются для различных исследований генома человека: генетического скрининга наследственных заболеваний, пренатальной диагностики нарушений развития плода, генетического консультирования, генной терапии наследственных заболеваний, генетической дактилоскопии и др. Данные исследования позволяют выявлять и предотвращать генетические заболевания, значительно повышают эффективность лечения, открывая новые возможности для персонифицированной медицины, используются в криминалистике. Молекулярно-генетические методы характеризуются достаточно сложной методикой, и интерпретация результатов в значительной степени зависти от точности проведенного исследования.

Обработка биологического материала и выделение нуклеиновых кислот – первый и важнейший этап молекулярно-генетического исследования. Основной задачей данного этапа является получение очищенного препарата ДНК для последующей реакции амплификации. Биологический материал человека – сложная многокомпонентная система, которая содержит большое количество веществ – ингибиторов, подавляющих реакцию амплификации. От того насколько эффективно они будут удалены и инактивированы, зависит в конечном счете чувствительность всего молекулярно-генетического теста.

Производители реактивов для молекулярно генетических исследований предлагают разнообразные методики выделения ДНК, однако эффективность данных методик недостаточно изучена.

**Цель исследования** - изучить эффективность различных методов выделения и очистки ДНК из нескольких биологических субстратов человека (кровь, волос, кость).

В связи с поставленной целью выделены следующие **задачи**:

1. Выделить ДНК из крови, волоса, кости с использованием различных методов (кремниевый сорбент, магнитный сорбент).
2. Оценить количество ДНК, выделенной различными методами из крови, волоса и кости.
3. Оценить степень очистки ДНК, выделенной различными методами из крови, волоса и кости для каждой исследованной ткани.

# Основная часть

Обзор литературы по теме исследования представлен в приложении 1.

## 1.1. Материалы и методы исследования

В качестве материала в исследовании использовались образцы крови, волос, кости человека.

Выделение ДНК из каждого образца проводилось с использованием кремниевого сорбента и магнитных частиц. Для выделения использовались образцы костного порошка по 52 мкг, высушенные образцы крови площадью по 2 мм2 и образцы волос по 4 волосяной луковицы в каждом. Выделение ДНК проводилось в соответствии с протоколами фирм-производителей (Приложение 2).

Математическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета программ EXCEL 2007 (Microsoft, USA). Вычисляли среднюю концентрацию ДНК, выделенной из различных биологических субстратов различными методами. Рассчитывалось среднее значение () и ошибка среднего (m).

Для определения достоверности различий между средними значениями количества ДНК, выделенной различными методами, использовался t-критерий Стьюдента.



где - среднее арифметическое опытного варианта,

 - среднее арифметическое контрольного варианта,

 - ошибка отклонения, которая определяется при n1 = n 2



Отклонение считалось достоверным при р<0,05.

## 1.2. Результаты исследования и их обсуждение

Результаты, полученные при изучении эффективности методов выделения ДНК из костной ткани, представлены в таблице 1, 2, на рис. 1, таблицах 1, 2 приложения 3.

Для определения эффективности выделения ДНК различными методами было проведено сравнение количества выделенной ДНК попарно из нескольких образцов каждого субстрата. Для сравнения степени эффективности выделения ДНК определяли долю образцов, в которых её концентрация была выше при выделении одним из методов и среднее превышение концентрации выделенной ДНК по сравнению и альтернативным методом (таблица 2, рис. 1, таблицы 1, 2 приложения). Полученные данные позволяют отметить, что доля образцов с более высокой концентрацией ДНК была выше для всех биологических субстратов (волос, кость, кровь) при выделении с помощью магнитного сорбента. Среднее превышение концентрации ДНК при выделении данным методом наибольшее для крови (в среднем по всем образцам было выделено на 1,581693 нг/мкл больше ДНК). Для кости превышение концентрации по магнитному сорбенту также значительно (0,725505 нг/мкл). Количество ДНК, выделенной из луковиц волос, было недостаточным для обоих методов, однако с помощью магнитного сорбента удалось получить более концентрированные растворы ДНК.

Таблица 2

Доля образцов ДНК с более высокой концентрацией и среднее превышение концентрации ДНК при использовании магнитного и кремневого сорбента

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| субстрат | метод | Количество образцов с более высокой концентрацией ДНК | Доля образцов с более высокой концентрацией ДНК, % | Среднее превышение концентрации ДНК (разность) по сравнению с альтернативным методом, нг/мкл |
| волос | Магнитный сорбент | 5 | 71,43 | 0,002736 |
| Кремниевый сорбент | 2 | 28,57 | 0,00375 |
| кость | Магнитный сорбент | 7 | 87,50 | 0,725505 |
| Кремниевый сорбент | 1 | 14,29 | 0,11766 |
| кровь | Магнитный сорбент | 7 | 87,50 | 1,581693 |
| Кремниевый сорбент | 1 | 14,29 | 0,0269 |

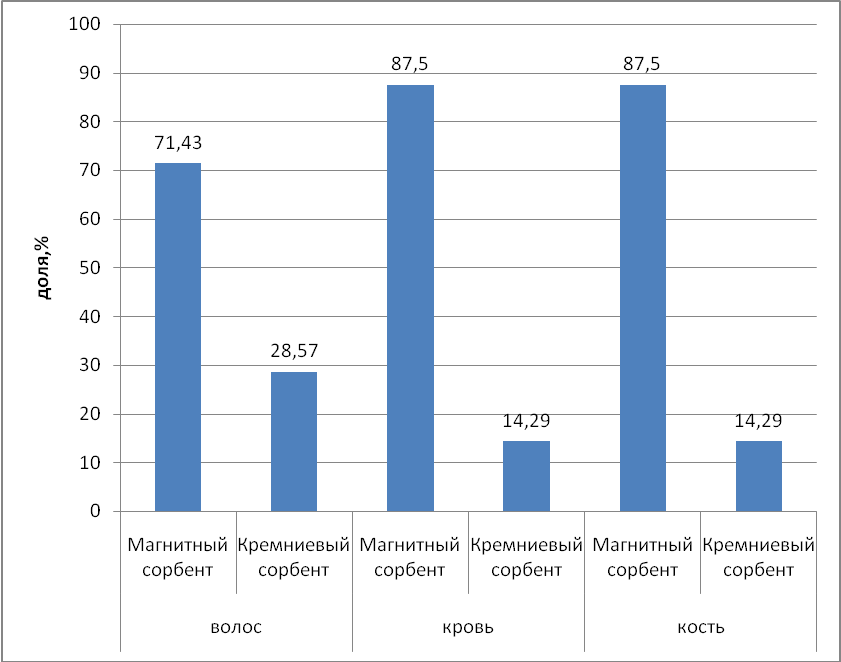


Рис.1. Доля образцов, в которых концентрация выделенной ДНК была выше по сравнению с другим методом.

Таким образом, сравнение попарно количества выделенной ДНК из образцов биологических субстратов человека показало, метод с использованием магнитных частиц эффективнее кремниевого сорбента. Эффективность методов выделения ДНК также оценивали по средним концентрациям, вычисленным на основании данных анализа нескольких образцов крови, кости и волос (таблица 3, рис. 2-4). В результате анализа данных по средней концентрации ДНК, выделенной из кости, полученных после ПЦР, было выявлено, что при выделении методом с использованием магнитного сорбента средняя концентрация ДНК выше, чем при выделении с помощью кремниевого сорбента, однако различия недостоверны.

Таблица 1

Концентрация ДНК, выделенной из различных образцов биологических субстратов человека с использованием магнитного и кремниевого сорбента

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| биологический субстрат | № образца | концентрация ДНК в нг/мкл | |
| Магнитный сорбент | Кремниевый сорбент |
| волосы | 1 | 0,004442 | 0,002783 |
| 2 | 0,003423 | 0,002932 |
| 3 | 0,000529 | 0 |
| 4 | 0,004125 | 0,006827 |
| 5 | 0,003000 | 0,007807 |
| 6 | 0,026649 | 0,01578 |
| 7 | 0,002809 | 0,002676 |
| кровь | 1 | 2,427521 | 0,962852 |
| 2 | 3,500559 | 0,884374 |
| 3 | 1,803705 | 0,495627 |
| 4 | 5,128132 | 2,142892 |
| 5 | 15,46406 | 14,34827 |
| 6 | 3,408325 | 2,422029 |
| 7 | 1,383494 | 1,410393 |
| 8 | 0,855047 | 0,259443 |
| кость | 1 | 4,571837 | 0 |
| 2 | 0,098506 | 0,001221 |
| 3 | 0,084541 | 0,2022 |
| 4 | 0,148637 | 0,001142 |
| 5 | 0,11608 | 0,01585 |
| 6 | 0,07847 | 0,005112 |
| 7 | 0,060997 | 0,00021 |
| 8 | 0,028162 | 0,000618 |

Недостоверность различий результатов, полученных изученными методами, может быть связана с нестабильностью и значительными колебаниями данных по повторностям. Различия количества выделенной ДНК могут быть обусловлены числом остеоцитов с сохранившейся ДНК в образцах костной ткани, т.к. проводилась примерная оценка их количества в образце. Точную оценку количества клеток с ДНК в образце костной ткани произвести невозможно.

Следует отметить, что, несмотря на недостоверность различий данных по двум методам выделения, среднее, минимальное и максимальное количество ДНК выделенной из кости с помощью магнитного сорбента значительно выше. Это позволяет заключить, что магнитный сорбент более эффективен для выделения ДНК из кости, по сравнению с кремниевым сорбентом. Средние значения концентрации ДНК, выделенной двумя методами из крови человека, достоверно не различаются. Количество ДНК было достаточным для дальнейшего исследования для обоих методов (более 0,125 нг/мкл). Однако при выделении с помощью магнитного сорбента среднее, максимальное и минимальное значение выделенной ДНК было выше, чем для кремневого сорбента. Следовательно, выбор метода выделения ДНК из крови должен быть обусловлен учетом других параметров эффективности методов выделения ДНК (стоимость одного выделения, отсутствие ингибиторов ПЦР, затраты времени на выделение).



Рис.2. Средняя концентрация ДНК, выделенной из образцов кости.

Анализ данных по выделению ДНК из луковиц волос человека с помощью двух методов, позволяет отметить, что средняя концентрация ДНК была низкой в обоих случаях и достоверно не различалась. Максимальное количество выделенной ДНК было выше при использовании магнитного сорбента.



Рис.3. Средняя концентрация ДНК, выделенной из образцов крови.

Таким образом, сравнение методов по количеству выделенной ДНК, показало, что доля образцов с более высокой концентрацией ДНК, средняя и максимальная концентрация выделенной ДНК выше при использовании магнитного сорбента для всех изученных биологических субстратов (кровь, кость, луковицы волос).



Рис.4. Средняя концентрация ДНК, выделенной из образцов луковиц волос.

Результаты, полученные при изучении качества ДНК, выделенной из кости, представлены в таблице 4 и на рис.5.

**Таблица 3**

**Среднее, максимальное и минимальное количество ДНК, выделенное различными способами из биологических субстратов человека**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Биологический субстрат** | **Метод выделения** | **Среднее количество ДНК в нг/мкл** | **Минимальное количество выделенной ДНК в нг/мкл** | **Максимальное количество выделенной ДНК в нг/мкл** | **t-критерий Стьюдента** |
| кость | Кремниевый сорбент | 0,032336±0,028388 | 0,000210 | 0,202200 | 1,104996 |
| Магнитные частицы | 0,648404±0,560634 | 0,028162 | 4,571837 |
| кровь | Кремниевый сорбент | 2,865735±1,661771 | 0,259443 | 14,348270 | 0,585393 |
| Магнитные частицы | 4,246355±1,673557 | 0,855047 | 15,464055 |
| волос | Кремниевый сорбент | 0,004851±0,001851 | 0,002676 | 0,015780 | 1,097822 |
| Магнитные частицы | 0,005622±0,003056 | 0,007066 | 0,026649 |

100% образцов ДНК, выделенных обоими методами, подходят для проведения ПЦР, ни один образец не содержит ингибиторов в концентрации, подавляющей реакцию. Однако стоит отметить, что во всех случаях образцы, выделенные при помощи магнитных частиц, содержат незначительное количество ингибиторов, а образцы, выделенные методом с использованием кремниевого сорбента, ингибиторов практически не содержат. Сравнение методов также проводилось по стоимости выделения одного образца ДНК, времязатратности и трудоемкости (таблица 5). Изученные методы практические не различаются по затратам времени на одно выделение и трудоемкости. Однако стоимость выделения одного образца для метода с использованием магнитных частиц в 13 раз выше.

Таблица 4

Содержание ингибиторов в образцах ДНК, выделенных с помощью магнитного и кремниевого сорбентов

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Субстрат | метод | Количество образцов, не содержащих ингибиторы | Доля образцов не содержащих ингибиторы, % | Количество образцов с незначительным содержанием ингибиторов | Доля образцов с незначительным содержанием ингибиторов, % |
| волос | Магнитный сорбент | 7 | 100 | 0 | 0 |
| Кремниевый сорбент | 7 | 100 | 0 | 0 |
| кровь | Магнитный сорбент | 5 | 62,5 | 3 | 37,5 |
| Кремниевый сорбент | 7 | 87,5 | 1 | 12,5 |
| кость | Магнитный сорбент | 3 | 37,5 | 5 | 62,5 |
| Кремниевый сорбент | 8 | 100 | 0 | 0 |

Такая разница может быть объяснена тем, что магнитными частицами выделяется избыток ДНК, который является ингибитором ПЦР.



Рис.5. Доля образцов ДНК биологических субстратов человека с различным содержанием ингибиторов.

Поэтому для свежих и образцов биологических субстратов достаточного объема (например, специально отобранные образцы крови) можно использовать более дешевый кремниевый сорбент. Для сложных образцов, имеющих малый объем (луковицы волос, кость, маленькие пятна крови) предпочтительнее использовать магнитный сорбент.

Таблица 5

Стоимость и время выделения одного образца ДНК с помощью магнитного и кремниевого сорбента

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Метод выделения ДНК | стоимость одного выделения, руб. | затраты времени на одно выделение | доля образцов, из которых было выделено ДНК более 0,125 нг/мкл (%) |
| Рrepfiler-express, Applied Biosystems (магнитный сорбент) | 228 | 30 мин. | волос – 0%  кровь – 100%  кость – 25% |
| S-сорб, Синтол (кремниевый сорбент) | 16,75 | 40 мин. | волос – 0%  кровь – 100%  кость – 12,5% |

# 

# 2. Заключение

## 2.1. Выводы

1. Для всех изученных биологических субстратов (кровь, кость, волос), преобладающая доля образцов с более высокой концентрацией ДНК была получена при использовании магнитного сорбента. Среднее превышение концентрации ДНК по сравнению с кремниевым сорбентом составило 0,002736 (для луковиц волос), 0,725505 (для кости) и 1,581693 (для крови).
2. Средняя и максимальная концентрация ДНК, выделенной с помощью магнитных частиц из кости и крови, превышает показатели, полученные кремниевым сорбентом.
3. Степень очистки ДНК, выделенной из всех изученных биологических субстратов была достаточной для дальнейших молекулярно-генетических исследований при использовании магнитного и кремниевого сорбента. Незначительная ингибиция ПЦР в образцах ДНК, полученных магнитным сорбентом, связана с избытком ДНК, являющимся ингибитором ПЦР.
4. Сравнение стоимости выделения одного образца, трудоёмкости и затрат времени на одно выделение показало, что метод с использованием магнитных частиц рекомендуется использовать для сложных биологических, для образцов достаточного объема и сохранности подходит метод с использованием кремниевого сорбента.

# Список литературы

1. Антонова О.С., Корнева Н.А., Белов Ю.В., Курочкин В.Е. Эффективные методы выделения нуклеиновых кислот для проведения анализов в молекулярной биологии // Научное приборостроение – Т.20. №1, 2010. С.3-9.
2. Бадзюк И.Л., Голодков Ю.Э., Ларионова Е.Ю. Анализ современных методов извлечения ДНК из биологических объектов судебной экспертизы.
3. Ведерников В.Е. Сравнительная характеристика способов экстракции нуклеиновых кислот // Лаборатория молекулярной диагностики ООО «Вега» ГК «Алкор Био», 2012. С.14-15.
4. Великов В.А. Молекулярная биология. Практическое руководство - Саратов, 2013.
5. Корниенко И.В.,Подготовка биологического материала для молекулярно-генетических идентификационных исследований при массовом поступлении неопознанных тел /Д.И. Водолажский, В.П. Вейко [и др.]. – Ростов-на-Дону: ООО «Росиздат». – 2001.
6. Маниатис Т. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Д. Сэмбрук. – М.: Мир, 1984.
7. Ребиков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю., Семёнов П.А., Савилова А.М., Кофиади И.А., Абрамов Д.Д. ПЦР «в реальном времени» 2-е издание, исправленное / Под ред.Д.В. Ребикова. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. С.39-64.
8. Судомина М.А. Методы оценки качества нуклеиновой кислоты, получаемой в процессе выделения [Электронный ресурс] URL: <http://www.sileks.com/ru/librarian/librarian_ajax.php?ajaxaction=GetObjectByVName&VName=Normalization_and_estimation_of_NA_quality.pdf> .
9. Тейлор Д., Грин Н., Стаут У. Биология в 3-х томах. – Т.1. М: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2014. С.129-132.

## Приложение 1

## Обзор литературы

## 1.1. Строение молекулы ДНК

Нуклеиновые кислоты необходимы для жизни. Они представляют собой генетический материал всех живых организмов. Выяснение структуры ДНК – одного из двух существующих типов нуклеиновых кислот – открыло новую эпоху в биологии, так как позволило, наконец, понять, каким образом живые организмы хранят информацию, необходимую для регулирования их жизнедеятельности и каким образом передают эту информацию своему потомству. Нуклеиновые кислоты состоят из мономерных единиц, называемых нуклеотидами.

Молекула нуклеотида состоит из трех частей – пятиуглеродного сахара, азотистого основания и фосфорной кислоты.

Сахар, входящий в состав нуклеотида, содержит пять углеродных атомов, т.е. представляет собой пентозу. Дезоксирибонуклеиновые кислоты (ДНК) содержат дезоксирибозу. В дезоксирибозе – ОН-группа при 2-м атоме углерода заменена на атом Н.

«В нуклеиновых кислотах содержится основания четырех различных видов: два из них относятся к классу пуринов и два - к классу пиримидинов. К числу пуринов относятся аденин(А) и гуанин(Г), а к числу пиримидинов – цитозин(Ц) и тимин(Т). В молекуле пуринов имеется два кольца, а в молекуле пиримидинов – одно. Основания принято обозначать первой буквой их названия: А, Г, Т и Ц.»[[1]](#footnote-1)

«Нуклеиновые кислоты являются кислотами, потому что в их молекуле содержится фосфорная кислота.

Два нуклеотида, соединяясь, образуют динуклеотид в результате реакции конденсации между фосфатной группой одного нуклеотида и сахаром другого. При синтезе полинуклеотидов этот процесс повторяется несколько миллионов раз.

Нуклеиновые кислоты, подобно белкам, обладают первичной структурой (под которой подразумевается их нуклеотидная последовательность) и трехмерной структурой.

ДНК состоит из двух полинуклеотидных цепей. Каждая цепь закручена в спираль вправо, и обе они свиты вместе, т.е. закручены вправо вокруг одной и той же оси, образуя двойную спираль. Цепи антипараллельны, т. е. направлены в противоположные стороны. Каждая цепь состоит из сахарофосфатного остова, вдоль которого перпендикулярно длинной оси двойной спирали располагаются основания: находящиеся друг против друга основания двух противоположных цепей двойной спирали связаны между собой водородными связями. Аденин связывается с тимином, а гуанин – с цитозином; АТ-пара соединяется двумя водородными связями, а ГЦ-пара – тремя. Никаких ограничений относительно последовательности нуклеотидов в одной цепи не существует, но в силу правила спаривания оснований эта последовательность в одной цепи определяет собой последовательность нуклеотидов в другой цепи. Поэтому мы говорим, что две цепи двойной спирали комплементарны друг другу.

ДНК способна нести в себе закодированную информацию и точно воспроизводиться (реплицироваться)».[[2]](#footnote-2)

Изучение последовательности нуклеотидов в ДНК человека в настоящее время широко используется для идентификации личности, медицинских, популяционных исследований и др. Поэтому необходима разработка и исследование эффективности методов выделения ДНК из различных тканей.

## 1.2. Особенности крови, волоса и костной ткани, как объектов для выделения ДНК[[3]](#footnote-3)

### 1.2.1. Выделение ДНК из крови

ДНК можно выделить из любых тканей, клетки которых содержат ядра, но количественный выход из разных тканей может быть различным. Довольно часто для выделения ДНК используют кровь. Лейкоциты крови, в отличие от зрелых эритроцитов, содержат ядра. Общей ДНК, выделенной из 100 мкл цельной крови достаточно для проведения нескольких рестрикций, ПЦР и секвенирования. Митохондриальная ДНК и РНК также присутствуют в получаемом препарате.[[4]](#footnote-4) Кровь, с точки зрения выделения из нее нуклеиновых кислот, является трудным объектом, поскольку содержит большое количество белков (около 10% по массе), в том числе нуклеаз, РНК - и ДНК-связывающих белков, которые могут разрушать нуклеиновые кислоты и/или уводить их из водной фазы при фенольной депротеинизации. Кровь также содержит много различных ингибиторов ПЦР.

### 1.2.2. Выделение ДНК костной ткани

Костные ткани на данный момент вызывают больше всего трудностей при извлечении ДНК при проведении ДНК-анализа. Часто возникает необходимость извлекать ДНК остатков скелетов, пролежавших в химически агрессивной природной среде продолжительное время. Причем сложность состоит не только во временном факторе при проведении процедур по извлечению нуклеиновых кислот из костной ткани, но и в вопросе о сохранности структуры (т.е. сохранность генетической информации) в данных тканях по происшествию времени их хранения даже в «музейных» условиях. Существуют различные точки зрения на пригодность некоторых методов извлечения ДНК из костных тканей.

## 1.3. Требования к образцу выделенной ДНК для молекулярно-генетического исследования

К выделенным образцам ДНК предъявляются следующие требования.

1. ДНК необходимо получить в достаточном количестве (0,125нг).
2. ДНК следует получать в чистом виде, свободном от ингибиторов - нуклеаз и сопутствующих примесей: белков, органических растворителей, парафина, детергентов и т.п.
3. Выделенная ДНК также не должна содержать других нуклеиновых кислот.
4. Необходимо учитывать, что каждая дополнительная стадия очистки приводит к дополнительной затрате времени и средств, а также к потере вместе с примесями довольно значительной части целевого материала, что может являться неприемлемым в случае малого количества исходного образца. Увеличение количества стадий очистки уменьшает надежность нормализации по массе или объему исходного образца, поскольку эффективность этих стадий может несколько отличаться между отдельными экспериментами.

## 1.4. Основные этапы и методы выделения ДНК

Выделение ДНК из тканей включает следующие этапы:

1. Лизис клеток с помощью лизирующих факторов: гуанидин, лизоцим и т.д.
2. Удаление лишних примесей (белки, липиды и т.д.) из образца с помощью фенола, хлороформа, концентрированных солей и др.
3. Преципитация ДНК: осаждение (на этанол, изопропанол); преципитация на сорбент (glass milk, колонки).
4. Растворение ДНК

«В современной криминалистике по извлечению ДНК из биотканей наиболее часто используют два метода: фенольный и с помощью ионообменной смолы Chelex 100. Данные методы за годы применения зарекомендовали себя как наиболее надежные методы получения незагрязненных и неповрежденных образцов ДНК.

Фенольный метод является универсальным и пригоден для выделения ДНК практически из любых объектов, содержащих ДНК, в частности, из крови, спермы, волос, костей. При использовании этого метода происходит наиболее полное удаление белков и различных клеточных компонентов, в результате чего можно получить ДНК высокой степени очистки, пригодную для длительного хранения. К недостаткам метода относятся необходимость применения высокотоксичных реактивов и длительность процедуры выделения ДНК

Метод выделения ДНК с использованием ионообменной смолы Chelex 100 можно применять только, когда исследуемый объект не содержит больших количеств белков, его клетки легко лизируются и объект не подвергался длительному хранению. По сравнению с фенольным методом данный метод не требует применения токсичных реактивов и проводится в течение более короткого времени, как правило, используется для выделения нуклеиновых кислот из крови, спермы, слюны, волос».[[5]](#footnote-5)

«Экспресс экстракция на основе температурного лизиса — методика, позволяющая в кратчайшие сроки получить пригодный для постановки ПЦР-анализа препарат НК. Принцип метода: Клинический образец помещается в пробирку с лизирующим буфером, затем подвергается термической обработке, в процессе которой происходит деструкция кле- точных мембран, вирусных оболочек и других биополимерных комплексов и высвобождение НК. С помощью последующего центрифугирования нерастворимые компоненты осаждаются на дне пробирки, а надосадочная жидкость (супернатант), содержащая ДНК, используется для проведения ПЦР. Экспресс-метод успешно применяется для выделения ДНК таких возбудителей, как Mycobacterium tuberculosis, Chlamydia trachomatis, Mycoplasma genitalium и других инфекций передающихся половым путем (ИППП). В то же время при оценке эффективности выделения ДНК HPV (папилломавирус человека) из соскобов со слизистой урогенитального тракта отмечалось значительное увеличение эффективности в случае выделения сорбционным методом

С учетом перечисленных фактов, экспресс- методика уступает по чувствительности в 8-12 раз методикам на основе спиртового осаждения и сорбции на силике.

Для проведения анализа подходят образцы только с низким содержанием ингибиторов.

Спиртовое осаждение — в основе методики лежит агрегация НК в присутствие соли и спирта. Принцип метода. После осаждения спиртом НК отделяется от раствора центрифугированием. Осадок, содержащий целевую НК, отмывается 70% этиловым спиртом с последующим центрифугированием. После удаления супернатанта осадок подсуши- вается и растворяется в водном буфере. Роль соли в протоколе экстракции состоит в том, что её положительно заряженные ионы нейтрализуют отрицательный заряд на сахаро-фосфатном скелете НК, приводя к снижению растворимости последних в воде и к выпадению НК в осадок. Нужно отметить, что НК менее растворима в изопропаноле, чем в этаноле, соответственно для ее осаждения требуются меньшая концентрации изопропанола и его предпочтительнее использовать, если есть ограничения по объему используемого пластика (например, есть возможность добавить только один объем образца). В ряде протоколов экстракции предлагается проводить осаждение (преципитацию) НК при пониженной температуре (–20°С). Однако, есть исследователи не согласные с этой теорией; по результатам их экспериментов температура инкубации со спиртом не имеет значительного влияния на выход продукта. Главенствующая роль, по их мнению, должна быть отведена продолжительности центрифугирования

Сорбционная экстракция – методика, в основе которой лежит избирательная сорбция на поверхности силики в присутствие хаотропной соли. Ингибиторы и другие компоненты клинического материала остаются в растворе. С помощью центрифугирования силика с НК осаждается, а супернатант c ингибиторами ПЦР удаляется. Серия последующих отмывок обеспечивает получение высокоочищенного препарата НК. Принцип метода. Как и во всех процедурах экстракции НК на первом этапе проводится лизис биологического образца. Чаще всего для лизиса используются хаотропные агенты, например гуанидин тиоцианат, которые дестабилизируют водородные связи, вандерваальсовы и гидрофобные взаимодействия. В таких условиях растворимость НК в воде снижается, а белки денатурируют. Хаотропная соль необходима не только для лизиса, но и для процесса сорбции НК. Также для усиления процесса сорбции в некоторых протоколах рекомендуют добавлять спирт».[[6]](#footnote-6)

Использование магнитных твердых носителей в биохимических и молекулярно биологических процессах имеет много преимуществ по сравнению с немагнитными сепарационными методами. Обычно магнит прикладывается к стенке сосуда, содержащего образец, чтобы частицы агрегировали у стенки сосуда, а остаток образца можно было убрать. Таким способом можно отделять компоненты клеточного лизата, которые ингибируют ДНК-полимеразу и ПЦР-реакцию, например полисахариды, фенольные компоненты, гумус. Для процесса выделения используются магнитные носители с иммобилизированными аффинными лигандами или изготовленные из биополимера, увеличивающего аффинность к нужной нуклеиновой кислоте. Магнитные носители имеются в продаже или могут быть изготовлены в лаборатории. Магнитные частицы производятся из различных синтетических полимеров, биополимеров, пористого стекла или на основе неорганических магнитных материалов, таких как оксид железа с модифицированной поверхностью. Особенно подходят для выделения суперпарамагнитные частицы, которые не взаимодействуют друг с другом в отсутствие магнитного поля. Эти частицы приобретают магнитный момент в сильном магнитном поле, но не сохраняют постоянного магнетизма, когда поле убирают. Если устранены магнитная агрегация и слипание частиц, то в течение реакции достигается суспензирование частиц и единообразная экстракция нуклеиновых кислот.[[7]](#footnote-7)

## 1.5. Методы оценки количества выделенной ДНК

Наиболее распространенными методами оценки выделенных нуклеиновых кислот являются следующие методы:

1. электрофорез в акриламидном или агарозном геле;
2. спектрофотометрическая оценка по уровню поглощения;
3. флуориметрическая оценка с использованием флуоресцентных красителей;
4. гибридизация со специфическим зондом;
5. полимеразная цепная реакция (ПЦР).

При оценке количества нуклеиновой кислоты нужно принимать во внимание наличие в полученном образце всевозможного рода примесей.[[8]](#footnote-8)

## 1.6. ПЦР в реальном времени[[9]](#footnote-9)

**ПЦР в реальном времени (Real-Time PCR).** В настоящее время на смену визуальной оценке результатов ПЦР методом электрофореза уверенно приходят флуоресцентные методы детекции продуктов амплификации. Получать и интерпретировать результаты ПЦР становится проще, быстрее и надежнее.

Одним из флуоресцентных методов является метод ПЦР в режиме реального времени. В его основе лежит принцип флуоресцентной детекции продуктов ПЦР непосредственно в ходе амплификации. Детекция продуктов амплификации проводится прямо в реакционной среде через стенки или крышку закрытой пробирки.

В состав реакционной смеси наряду с праймерами и остальными компонентами реакции добавлены специальные флуоресцентные метки (зонды). Флуоресцентный зонд представляет собой олигонуклеотид, комплементарный внутренней последовательности амплифицируемого фрагмента ДНК возбудителя. На 3’-конце зонда находится флуоресцентная молекула – флуорофор, а на 5’-конце расположена молекула-“гаситель” флуоресценции. За счет близости флуорофора и «гасителя» вся энергия, поглощенная флуорофором, переходит на “гаситель” по принципу флуоресцентно-резонансного переноса энергии. При этом сигнал флуоресценции отсутствует.

В ходе ПЦР при повышении температуры происходит денатурация ДНК возбудителя, и зонд наряду с праймерами гибридизуется с комплементарным участком ДНК.

В процессе синтеза новой цепи ДНК, фермент ДНК-полимераза расщепляет этот зонд. При расщеплении зонда флуорофор отделяется от «гасителя», расстояние между ними увеличивается, процесс тушения флуоресценции становится невозможным. В этот момент можно зарегистрировать флуоресцентный сигнал от флуорофора.

В результате такого принципа неспецифическая амплификация не обнаруживается.

**ПЦР в реальном времени** имеет ряд значительных преимуществ:

1. Объединение этапов амплификации и детекции результатов. Появляется возможность оценить кинетику процесса, которая зависит от начального количества исследуемого материала
2. Существенное снижение риска контаминации и ошибок при анализе результатов
3. Высокая специфичность реакции за счет использования высокоспецифичных флуоресцентных зондов.
4. Высокая производительность
5. Упрощение требований к организации ПЦР-лаборатории
6. Возможность количественной оценки исходной ДНК матрицы
7. Регистрация и учет данных в электронном формате

ПЦР в реальном времени характеризуется возможностью проведения качественного и количественного анализа. Регистрируемое в процессе амплификации нарастание сигнала от отделенного флуорофора прямо пропорционально увеличению концентрации синтезированных специфических продуктов и отражает концентрацию ДНК в исходной матрице.

Для проведения анализа необходим специальный прибор [амплификатор](http://www.lytech.ru/catalog_27.htm) для ПЦР в реальном времени, который совмещает в себе функции термоциклера и флуоресцентного детектора.

Программное обеспечение таких приборов позволяет сопоставлять кинетику реакции в исследуемых и стандартных образцах и вычислять концентрацию исходной матрицы ДНК (в присутствии стандартных образцов с известной концентрацией анализируемой ДНК). При выявлении ДНК возбудителей инфекционных заболеваний целесообразно использовать данный метод в количественной оценке только тех инфекционных агентов, количественное содержание которых в анализируемом образце действительно имеет клиническую значимость. Определение количественных характеристик инфекции позволяет судить о динамике и стадии заболевания, а также об эффективности проводимой терапии.

Высокая чувствительность ПЦР-анализа выдвигает жесткие требования к правилам выделения ДНК из биологического материала.[[10]](#footnote-10)

## Приложение 2

## 1. Выделение ДНК с использованием кремниевого сорбента

Выделение ДНК с использованием кремниевого сорбента (S-сорб, Синтол) включало следующие этапы:

**1. Внесение образца**

1.1.'Промаркировали необходимое количество пробирок объемом 1.5 или 2 мл в

соответствие с количеством анализируемых проб и дополнительной

пробиркой для отрицательного контроля выделения «ОКО-В». Во все

пробирки (кроме «ОКО-8») внесли по 100 мкл образца.

**2. Лизис материала и сорбция ДНК**

2.1. В каждую пробирку внесли 300 мкл Лизирующего раствора. Перемешали содержимое на вортексе. Прогрели при 65°С 5 мин. Сбросили капли с крышки пробирки кратным центрифугированием

2.2. Тщательно перемешали суспензию сорбента. Добавили в пробирки по 30 мкл Сорбента.

2.3. Перемешали на вортексе и оставили в штативе на 2 минуты. После чего снова

перемешали и оставили на 2мин.

**3. Отмывка сорбента от ингибиторов**

3.1. Центрифугировали пробирки 30 с при 5 тыс/об. Удалили надосадочную

жидкость с помощью вакуумного отсасывателя.

3.2. Добавили к осадку З00 мкл Отмывочного раствора 1 и перемешали на

вортексе.

3.3. Центрифугировали пробирки 30 с при 5.тыс/об. Удалили надосадочную жидкость с помощью вакуумного отсасывателя.

3.4. Добавили к осадку 500 мкл Отмывочного раствора 2 и перемешали на вортексе.

3.5. Центрифугировали пробирки при 5 тыс/об 30 сек. Удалили надосадочную жидкость с помощью вакуумного отсасывателя.

3.6. Повторили п. 3.4-3.5

3.7. Подсушили сорбент в термостате при 65°С 15 мин.

**4. Элюция ДНК**

4.1. Добавили к осадку 100 мкл Элюирующего раствора Перемешали и

прогрели при 65°С 5 мин.

* 1. Центрифугировали пробирки при 13 тыс/об 2 мин. Надосадочную жидкость содержащую ДНК перенесли в чистую пробирку.

## 2. Выделение ДНК с использованием магнитных частиц

Выделение ДНК с помощью магнитного сорбента PrepFiler (Applied Biosistems) проводилось следующим образом:

1. **Проведение лизиса**
   1. Нагрели нагревательный блок до 70 °C.
   2. Поместили образец в стандартную микроцентрифужную пробирку емкостью 1,5 мл.
   3. Добавили Лизирующий буфер PrepFiler™: 300 мкл
   4. Закрыли пробирку крышкой, встряхнули на вортексе в течение 5 секунд, затем быстро открутили на центрифуге.
   5. Поместили пробирку в термошейкер и провели инкубацию при 70 °C 900 об/мин в течение 40 минут.
2. **Удаление субстрата из лизированного образца**
   1. Отцентрифугировали пробирку с образцом в течение 2 секунд, чтобы собрать конденсат с крышки.
   2. Вставили фильтровальную колонку PrepFiler™ в новую центрифужную пробирку PrepFiler™, затем осторожно перенесли содержимое пробирки с образцом в фильтровальную колонку.
   3. Закрыли крышкой фильтровальную колонку с центрифужной пробиркой, а затем отцентрифугировали на скорости 12000-14000 об/мин в течение 2 минут.
   4. Проверили объем лизата в пробирке. Если объем составлял менее 180 мкл, центрифугировали фильтровальную колонку с пробиркой в течение дополнительных 5 минут.
   5. Удалили фильтровальную колонку из пробирки и утилизировали ее.
3. **Связывание геномной ДНК с магнитными частицами**
   1. Дали лизированному образцу остыть до комнатной температуры.
   2. Встряхнули пробирку с магнитными частицами PrepFiler™ на вортексе в течение 5 секунд, перевернули пробирку и убедились в том, что на дне пробирки нет осадка магнитных частиц, затем быстро открутили на центрифуге.
   3. Внесли 15 мкл магнитных частиц в пробирку с лизированным образцом.
   4. Закрыли крышкой пробирку с лизированным образцом, встряхнули на вортексе на маленькой скорости (приблизительно 500-1200 об/мин) в течение 10 секунд, затем быстро отцентрифугировали.
   5. Добавили 180 мкл изопропанола в пробирку с лизированным образцом.
   6. Закрыли крышкой пробирку с лизированным образцом, встряхнули на вортексе на маленькой скорости (приблизительно 500-1200 об/мин) в течение 5 секунд, затем быстро отцентрифугировали.
   7. поместили пробирку с лизированным образцом в шейкер перемешайте при комнатной температуре на скорости 1000 об/мин в течение 10 минут.
4. **Отмывка связанной ДНК**
   1. Встряхнули на вортексе пробирку с образцом ДНК на максимальной скорости (приблизительно 10000 об/мин) в течение 10 секунд, затем быстро отцентрифугировали.
   2. Убедились, что магнитный штатив установлен правильно.
   3. Поместили пробирку с образцом ДНК в магнитный штатив и подержали до тех пор, пока осадок из магнитных частиц не прекратил накапливаться.
   4. Не вынимая пробирку с образцом ДНК из магнитного штатива, осторожно удалили пипеткой и утилизировали всю надосадочную жидкость.
   5. Выполнили пункты a – д три раза:

А) Добавили 300 мкл подготовленного отмывочного буфера PrepFiler™ в пробирку с образцом ДНК.

Б) Закрыли крышкой пробирку с образцом ДНК и извлекли ее из магнитного штатива.

В) Тщательно встряхнули пробирку на вортексе на максимальной скорости (приблизительно 10000 об/мин) до тех пор, пока видимый осадок на стенке пробирки не растворился, затем быстро открутили на центрифуге.

Г) Поместили пробирку с образцом ДНК в магнитный штатив на 30-60 секунд.

Д) Не вынимая пробирку с образцом ДНК из магнитного штатива, осторожно удалили пипеткой и утилизировали надосадочную жидкость.

* 1. Не вынимая пробирку с образцом ДНК из магнитного штатива, открыли ее, оставили сушиться на воздухе в течение 7 -10 минут.

1. **Элюция ДНК**
   1. Нагрели нагревательный блок до 70 °C.
   2. Добавили 50 мкл буфера для элюции PrepFiler™ в пробирку с образцом ДНК.
   3. Закрыли крышкой пробирку с образцом ДНК, тщательно встряхнули пробирку на вортексе на максимальной скорости (приблизительно 10000 об/мин) до тех пор, пока видимый осадок магнитных частиц не растворился (около 5 секунд), затем быстро открутили на центрифуге.
   4. Поместили пробирку в термошейкер, инкубировали при 70 °C и 900 об/мин в течение 5 минут.
   5. Тщательно встряхнули пробирку на вортексе на максимальной скорости (приблизительно 10000 об/мин) до тех пор, пока видимый осадок магнитных частиц не растворился (около 5 секунд), затем быстро открутили на центрифуге.
   6. Поместили пробирку с образцом ДНК в магнитный штатив и держали до тех пор, пока осадок не перестал накапливаться (по меньшей мере, на 1 минуту).
   7. Перенесли надосадочную жидкость из пробирки с образцом ДНК (теперь в ней содержится изолированная геномная ДНК) в микроцентрифужную пробирку емкостью 1,5 мл для хранения.

## Приложение 3

Таблица 1

Графики накопления продуктов ПЦР для ДНК выделенной с помощью магнитного (1) и кремниевого (2) сорбента из луковиц волос

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **№ образца** | **график** | **№ образца** | **график** |
| 1 |  | 6 |  |
| 3 |  | 7 |  |

Таблица 2

Графики накопления продуктов ПЦР для ДНК выделенной с помощью магнитного (1) и кремниевого (2) сорбента из кости

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **№ образца** | **график** | **№ образца** | **график** |
| 2 |  | 5 |  |
| 4 |  | 8 |  |

1. Т. Маниатис, Э. Фрич, Д. Сэмбрук Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование [↑](#footnote-ref-1)
2. Тейлор Д., Грин Н., Стаут У. Биология в 3-х томах. – Т.1. М: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2014. С.129-132. [↑](#footnote-ref-2)
3. На основе работы Бадзюка И.Л., Голодкова Ю.Э., Ларионовой Е.Ю. « Анализ современных методов извлечения ДНК из биологических объектов судебной экспертизы» [↑](#footnote-ref-3)
4. Великов В.А. Молекулярная биология. Практическое руководство [↑](#footnote-ref-4)
5. Бадзюк И.Л., Голодков Ю.Э., Ларионова Е.Ю. « Анализ современных методов извлечения ДНК из биологических объектов судебной экспертизы» [↑](#footnote-ref-5)
6. Ведерников В.Е. Сравнительная характеристика способов экстракции нуклеиновых кислот // Лаборатория молекулярной диагностики ООО «Вега» ГК «Алкор Био», 2012. С.14-15. [↑](#footnote-ref-6)
7. По материалам Антоновой О.С., Корневой Н.А., Белова Ю.В., Курочкина В.Е. Эффективные методы выделения нуклеиновых кислот для проведения анализов в молекулярной биологии [↑](#footnote-ref-7)
8. Судомина М.А. Методы оценки качества нуклеиновой кислоты, получаемой в процессе выделения [↑](#footnote-ref-8)
9. По книге Ребикова Д.В. «ПЦР «в реальном времени»» [↑](#footnote-ref-9)
10. В. Корниенко, Д.И. Водолажский, В.П. Вейко Подготовка биологического материала для молекулярно-генетических идентификационных исследований при массовом поступлении неопознанных тел И [↑](#footnote-ref-10)