

УДК 579

*С.А.Тагиева*

*Институт микробиологии НАН Азербайджана  
safada.tagiyeva@yahoo.com*

## **ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕССА ЭКСТРАКЦИИ ДНК ИЗ РАЗЛИЧНОГО БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИЙ**

*Ключевые слова:* ДНК, РНК, экстракция, ПЦР, лаборатория, биоматериал

Суммируя и обобщая многолетний опыт работы в области молекулярной биологии, в частности, в отделе экстракции нуклеиновых кислот, автор раскрывает тему получения ДНК и РНК, соответствующего требованиям таких процессов детекции микроорганизмов и генетических мутаций, как полимеразная цепная реакция, масс-спектрометрия протоколы ISEQ и IPLEX, секвенация и так далее. Наглядно показаны возможные недостатки и оплошности, возникающие в ходе экстракции нуклеиновых кислот. Остановившись на каждом этапе экстракции, объясняются происходящие в пробирке процессы, проведён сравнительный анализ различных методов автоматического и мануального выделения. Особенное внимание уделено стадии пробоподготовки в зависимости от целей исследования и специфики биологического материала. Указываются возможные ошибки и способы их устранения, а так же эффективные методики оптимизации количества и качества пробы с учётом разнообразия методов приложения ДНК и РНК в лабораториях медицинского и ветеринарного профиля. Обсуждается важность измерения концентрации проб ДНК, протеина и ингибиторов (в основном, полисахаридов) до начала ПЦР либо выбранного генетического исследования. Статья носит методический характер и рекомендации, отражённые в материалах статьи, безусловно, могут быть полезными для специалистов любой лаборатории соответствующего профиля.

*Ş.Ə. Tağıyeva*

## **İNFEKSİYALARIN DİAQNOSU ÜÇÜN MÜXTƏLİF BİOLOJİ MATERİALDAN DNT ÇIXARILMASI PROSESİNİN OPTİMALLAŞDIRILMASI**

*Açar sözlər:* DNT, RNT, ekstraksiya, PCR, laboratoriya, biomaterial

Molekulyar biologiya sahəsində, xüsusən də nuklein turşuları ekstraksiyası sahəsində uzunmüddətli təcrübənin nəticələrini ümumiləşdirərək müəllif DNT və RNT əldə etmək mövzusunı müzakirə edir. Məlumdur ki, nuklein turşularının kəmiyyəti və

keyfiyyəti mikroorqanizmlərin və genetik mutasiyaların aşkarlanması üçün istifadə olunan testlərə (məsələn, polimeraza zəncirvari reaksiyası, mass-spektrometriya İPLEX və İSEQ protokolları, sekvensasiya, və s.) uyğun olmalıdır. Bu məqalədə müəllif nuklein turşularının ekstraksiyası zamanı meydana çıxma biləcək və düzgün nəticələri əldə etməyə maneələr törədən çatışmazlıqları və xətalara açıq şəkildə göstərir. DNA emalının hər mərhələsini müzakirə edərək laborator borusunda baş verən prosesləri izah edir, müxtəlif avtomatik və manual ekstraksiya üsullarının müqayisəli təhlilini aparır. Analizin məqsədlərindən və bioloji materialın xüsusiyyətlərindən asılı olaraq nümunə hazırlamaq mərhələsinə xüsusi diqqət yetirilir. Tibbi və baytarlıq profilli DNT və RNT laboratoriyalarda uzunmüddətli təcrübədə müşahidə olunmuş çatışmazlıqlar və onların aradan qaldırılmasının yolları göstərilmişdir. Polimeraza Zəncirvari Reaksiyası (PZR) və ya müəyyən genetik testi başlamazdan əvvəl DNT nümunələrinin konsentrasiyasının, içindəki proteinlərin və inhibitorların (əsasən, karbohidratların) ölçülməsinin və tənzimlənməsinin əhəmiyyəti müzakirə olunur. Məqalə metodoloji xarakter daşıyır və təklif olunan tövsiyələr, əlbəttə ki, müvafiq profilli laboratoriyanın mütəxəssisləri üçün faydalı ola bilər.

*S.A.Taghiyeva*

## **OPTIMIZATION OF THE DNA EXTRACTION FROM VARIOUS BIOLOGY MATERIAL WITH THE PURPOSE OF DETECTION OF INFECTION**

**Keywords:** *DNA, RNA, extraction, PCR, laboratory, biomaterial*

Summarizing a rich own experience in the field of molecular biology, in particular, in the nucleic acid extraction department, the author reveals the topic of obtaining DNA and RNA that meets the requirements of subsequent processes for the detection of microorganisms and genetic mutations by such methods as PCR (Polymerase Chain Reaction), Mass-Spectrometry IPLEX and ISEQ protocols, sequencing and so far. In this article clearly illustrated the possible shortcomings and oversights that arise during the extraction of nucleic acids. The processes occurring in tube at the each stage of the extraction were explained. A comparative analysis of various methods of the automated and manual isolation was conducted. Particular attention was paid to the stage of sample preparation, depending on the objectives of the study and the specificity of the different biological material. Based on long-lasting background in DNA and RNA isolation laboratories of medical and veterinary profile, possible errors and ways to eliminate them were indicated. The importance of DNA concentration, proteins and inhibitors (especially, polysaccharides) measuring and optimization of the DNA samples prior to the start of PCR or the chosen genetic study was discussed. The article holds methodology character and recommendations advised in the materials of the article, of course, may be useful for specialists of any laboratory of the corresponding profile.

## **Введение**

Экстракция нуклеиновых кислот является первым и очень важным этапом в диагностике инфекционных и генетических заболеваний. От качества и количества (концентрации) выделенных нуклеиновых кислот зависит правильная диагностика медицинских и ветеринарных патогенов (SNP- Single Nucleotide Polymorphism) и мелких инсерций, делеций методами ПЦР и Масс-спектрометрии (MS технология MALDI-TOF protocol ISEG, IPLEX). Существует ещё целый ряд генетических исследований, таких как секвенирование, пиросеквенирование, гибридизация и так далее, которые начинаются с выделения генетического материала в виде ДНК и РНК. Многие процессы детекции требуют использования геномного (внутриядерного) ДНК, некоторые растворённого в крови беременных женщин фетального ДНК либо генетического материала плазмид цитоплазмы. Поскольку даже при самом активном инфекционном процессе количество геномного материала вируса либо бактерии мизерное. По сравнению с геномным ДНК, о выделенной пробе, как правило, судят косвенно по геномному ДНК.

### **Особенности правильного отбора биологической пробы.**

Процесс эффективного экстрагирования напрямую зависит от правильного обоснованного забора пробы и начинается задолго до лизиса уже на этапе, когда врач-ветеринар или медик определяет цель исследования на основании предварительного диагноза. При отборе проб нужно обратить внимание на течение инфекционного процесса. Поскольку вирусные инфекции отличаются цикличностью, ДНК (РНК) вируса возможно выделить только в момент очередного выброса в кровь (виремии), а ДНК бактерий во время бактеремии. Эти процессы обычно сопровождаются высокой температурой. Антибиотикотерапия является серьёзным препятствием для нормальной экстракции во-первых потому, что антибиотики снижают количество микроорганизма в крови, и во-вторых ингибируют ферменты ПЦР. Во время ремиссии, хроническом, латентном заболевании специалист в ходе экстрагирования может выделить небольшое количество геномного ДНК лейкоцитов крови, но оно, практически, не будет содержать ДНК патогена, поэтому при диагностике возможны ложно-отрицательные результаты.

Общеизвестно, что при отборе проб необходимо соблюдать правила асептики и антисептики и отбирать кровь без излишней спешки, поскольку, например, быстрый отбор крови может привести к гемолизу. Так же нужно учесть, что особенности диеты могут повлиять на результаты анализа. Например, этанол в крови либо высокое содержание жира после обильной жирной пищи, препятствуют нормальному процессу, так как жир забивает фильтры, а этанол разрушает нуклеиновую

кислоту. В ветеринарных лабораториях Патологический материал от каждого животного (птицы) и из каждого органа (мозг, печень, лёгкие) должен отбираться в отдельные контейнеры. Действительно, иногда практикуется отбор патматериала от нескольких (от 2 до 5) одновременно погибших птиц или животных из одного хозяйства в один контейнер. Это снижает вероятность обнаружения патогена и правильной интерпретации результата анализа. В случае положительного результата ПЦР невозможно будет определить, какое именно из животных было инфицировано.

Наиболее важным видится установление тропизма предполагаемого микроба – место его обычного скопления. К примеру, вирус бешенства, как правило, находится в головном мозге, а урогенитальные патогены могут быть обнаружены в урогенитальных мазках, сперме и, иногда, в моче. Считается нецелесообразным выделение ДНК хламидии в крови, поскольку этот микроб обладает тропностью к слизистым оболочкам глаз и урогенитального тракта и вероятность его обнаружения в крови приближается к нулю. Не выполнение этого правила так же может привести к ложно-отрицательным результатам. К сожалению, отечественные ветеринарные лаборатории ограничиваются ПЦР диагностикой на основе крови, патологического материала (тканей погибших животных) и, в редких случаях, абортивного материала животных. Такие важные позиции как исследование семени [2, с.118-119] для искусственного оплодотворения, клоакальных и трахеальных мазков [4] для диагностики птичьего гриппа и болезни Ньюкасла у живых птиц, мочи для диагностики бруцеллёза, кала для детекции энтеровирусов практически не задействованы.

Правильная нумерация, регистрация и маркировка отобранной пробы является важным условием для проведения анализа. Дублирование номера пробы, отсутствие нумерации, ошибки в кодировании, и регистрации, а также некорректная нумерация могут привести к неправильной интерпретации результата и должны быть обязательно исключены уже на этапе получения пробы из приемного отделения. Если имеются сомнения относительно происхождения пробы, она должна быть возвращена в приёмное отделение и отобрана повторно, так же, как и при установлении негодности пробы (недостаточное количество, загрязнение либо повреждение тары, несоответствие маркировке, наличие гемолиза в крови, гниение и разложение материала, невыполнение сроков доставки, условий хранения и нарушение холодной цепи). До начала эксперимента должно быть проверено соответствие пробирки определённому виду пробы. Имеется в виду такие погрешности, как отбор цельной крови в пробирку с гепарином, который является ингибитором ПЦР либо в

пробирку без добавок, что приведет к быстрому образованию сгустка и затруднит исследование. В практике частных клиник бывают случаи фальсификации пробы с целью дискредитировать лабораторию и показать непрофессионализм её специалистов. Например, имеются случаи, когда под видом мочи «пациенты» сдавали раствор фурацилина, а вместо крови – вишнёвый сок. Поэтому особенно тщательно нужно рассматривать пробы, которые не отбирали непосредственно в данной клинике. Имеется также ряд погрешностей, возникающих в связи с неправильной техникой отбора проб. Например, при неправильном отборе пробы мокроты пациент недостаточно откашливается и сплёвывает, в результате чего в пробе содержится больше слюны, чем мокроты, и специалист приёмного отделения должен обратить на это внимание, поскольку в такой пробе вероятность обнаружения, например, туберкулёзной палочки, будет очень низкой. Существует также устаревший метод консервации патологического abortивного материала и тканей мозга в формалине, который является мощным ингибитором ПЦР. Поэтому от такой пробы лучше отказаться, либо в случае острой необходимости, заранее замочить материал в дистиллированной воде на несколько часов, затем хорошенько ополоснуть. Можно ещё добавить дополнительный этап промывки в ходе экстракции. Все случаи обнаружения нестандартных проб и нестандартные ситуации в лаборатории должны быть запротocolированы, занесены в специальный журнал для принятия мер со стороны менеджера по качеству с целью предупреждения подобных ситуаций.

#### **Выбор метода экстракции нуклеиновых кислот**

Выбор оптимального метода экстракции из имеющихся в арсенале конкретной лаборатории методов является залогом успешной реакции и правильного результата анализа. Известно, что большинство лабораторий предпочитает мануальные методы автоматическим, так как они не уступают по конечному выходу и качеству нуклеиновых кислот. Мануальные методы немного более трудоёмкие, но затраты времени и средств на мануальное и автоматическое выделения примерно одинаковые [5, с.5-7]. При использовании автоматов затрачивается время на загрузку проб. Этап пробоподготовки в любом случае проводится вручную. Добавление реагентов, наконечников, уход за прибором, устранение возможных неполадок в программном обеспечении и самом процессе тоже требует затрат времени. Естественно, затрачивается и электроэнергия. Большинство приборов экстракции ДНК это так называемые закрытые системы, они, как правило, требуют использования дорогостоящих реагентов, наконечников, пробирок от производителя прибора, что создаёт определённые неудобства. Обычно аппараты не оправдывают себя при небольшом количестве проб. Возможно, поэтому

автоматы для выделения ДНК имеются в Азербайджане в очень ограниченном количестве. И в то же время, автоматическое выделение связано с ограничением человеческого фактора, получением более стандартных проб и имеет свои преимущества.

Переходя к наиболее распространённым современным механизмам экстракции, наиболее эффективным на сегодняшний день считается метод магнитной сепарации с использованием магнитных микрочастиц ММР (Magnetic Micro Particles) [1, с.3-9]. На втором месте – «колоночный» метод или метод «фильтрации» и на третьем – методы сорбции и преципитации. ММР метод предполагает использование специального оборудования, которое намагничивает биополимерные бусинки микрочастиц, обладающих афинностью («притяжением») к ДНК. Частицы, в свою очередь, притягивают молекулы ДНК из материала после этапа лизирования. Обычно к магнитным носителям прилагаются связывающие растворы, с помощью которых осуществляется селективное связывание нуклеиновых кислот РНК или ДНК. Например, для связывания вирусных нуклеиновых кислот применяются вирусные белки и комплиментарные ДНК- или РНК- последовательности. Затем ДНК смывают с частиц ММР с помощью моющего раствора и элюируют.

Метод экстракции с помощью спин-колонок основан на связывании ДНК на фильтрах колонок с дальнейшим высвобождением (элюцией). Он подходит для обработки большого количества проб в условиях лабораторий медицинских и ветеринарных клиник. Из производителей наиболее часто используют наборы QIAGENE, 5PRIME Fisher Scientific, MACHEREY. Наборы QIAGENE отличаются разнообразием и укомплектованы для различных биологических материалов от самых распространённых, таких как кровь, ткани, урогенитальные мазки, сперма, мокрота до редко используемых в условиях обычных клиник (кость, ногти, волосы, пятна крови) и т.д. Наборы 5PRIME [6, с.10] и MACHEREY-NAGEL обеспечивают высокую чувствительность при определении количественной вирусной нагрузки до и после лечения. Поэтому они хорошо подходят, например, для диагностики вирусного гепатита у людей.

Принцип преципитации и сорбции нуклеиновых кислот является одним из самых первых, он достаточно эффективен для повседневной диагностики, но к сожалению, практика показывает, что в выделенном таким образом нуклеиновых кислот процент положительных проб намного ниже, чем при экстракции с помощью спин-колонок. Это касается и российских (РИБО-сорб, РИБО-преп, ДНК-сорб) производителей и китайских (Liferiver), наборов, которые не могут конкурировать с колоночными.

### **Правильное проведение пробоподготовки**

Подготовка пробы к процессу экстракции очень важный этап и ошибки на этом этапе обязательно отражаются на детекции. Одной из главных задач пробоподготовки является обеспечение достаточного количества клеток для получения адекватного количества ДНК. Такие виды биологического материала, как моча или молоко содержат в себе намного меньше клеток, чем, допустим кровь или ткани. Поэтому их необходимо сконцентрировать, например, методом центрифугирования либо высушивания. Из прямых проб мочи получается очень низкое количество генетического материала (обычно от 2-до 11 мкг/мл), поэтому в них трудно обнаружить патогены. Практика показывает, что центрифугирование одновременно до 10 пробирок по 10 мл мочи на скорости 2000 оборотов в минуты в течении 10 минут позволяет получить осадок из 10 пробирок с достаточным количеством ДНК. Но в осадке мочи может содержаться много слизи и крови. Отмывание осадка неоднократным разведением таким же количеством воды для ПЦР, встряхиванием на вортексе и откручиванием на центрифуге с последующим удалением супернатанта помогает избавиться от лишнего белка слизи и ингибиторов крови. Аналогичная отмывка применяется для мазков и мокроты. Но такой материал как сперма, напротив, содержит очень большое количество генетического материала, который после выделения будет зашкаливать при измерении (более 1000мкг/л) и препятствовать нормальной ПЦР. Поэтому рекомендуется разводить нативную сперму в 10 раз и затем отмыть её, как указывалось ранее. Процесс концентрирования пробы необходим и для такого биологического материала, как молоко. Особое место в этом ряду занимают бактериальные культуры первого посева, содержащие очень большое количество неспецифических бактерий. Для получения достаточного числа именно патогенных клеток (обогащения) производится дополнительный посев культуры в селективном бульоне и инкубация в течение суток при температуре 37<sup>0</sup> С. А при использовании чистой культуры патогена, напротив, необходимо разведение материала. В инструкции к каждому набору обычно указывается, на какую концентрацию клеток рассчитаны реагенты данного набора.

### **Использование протокола экстракции ДНК (РНК)**

После пробоподготовки все пробы становятся примерно однородными по составу и оператор приступает к процедуре экстракции, указанной в инструкции к набору. Хочется заметить, что в некоторых отечественных лабораториях не принято вывешивать инструкцию на видном месте, в отдел ПЦР «святая святых» допускаются только «избранные» и протокол выделения передаётся буквально из уст в уста,

поскольку оригинал написан на иностранном языке, и это всё, конечно, не лучшим образом отражается на качестве выделения. В зарубежных лабораториях (Германия, США, Австрия) ситуация совершенно противоположная. Согласно правилам хорошей лаборатории “Good laboratory practice” [3, с.39-40], протокол исследования должен быть в доступном и известном для персонала месте и быть «перед глазами» во время теста независимо от того, в который раз оператор проводит исследование.

В правилах так же указано, что каждая лаборатория может адаптировать протокол с учётом условий лаборатории и особенностями проб. Но для того, чтобы отойти немного от инструкции, как и для того, чтобы строго следовать протоколу, оператор должен работать осмысленно, с пониманием происходящего процесса. Любые разговоры, наличие посторонних лиц в лаборатории могут привести к погрешностям и ошибкам. Например, при обучении нового оператора непосредственно во время процесса выделения ДНК желательно отложить все разговоры и объяснения и обсудить все вопросы позже.

Некоторые способы адаптации протокола, связаны с особенностями конкретной пробы. На этапе лизирования происходит расщепление клеточной стенки и ядерной оболочки и высвобождение нуклеиновых кислот. Чем твёрже и плотнее ткань пробы, тем более требуется длительная стадия лизиса, то есть больше, чем указано в протоколе. Желательно, чтобы проба растворилась. Для лучшего лизиса пробу нужно измельчить и взбить её на вортексе. При этом выход ДНК увеличивается, и чистота пробы улучшается. При колоночном методе имеется ещё один секрет хорошей промывки – моющим раствором нужно «пройтись» по всей внутренней поверхности спин-колонки, а не наливать его в середину. А вот добавление элюирующего раствора, напротив, желательно добавлять именно в центр колонки, где сконцентрировано ДНК. Повторная промывка фильтра тем же объёмом элюата во второй раз увеличивает выход почти на 50%, а в третий раз ещё на 10-15%.

Важность измерения полученной пробы ДНК (РНК) и методы оптимизации.

Чтобы оценить соответствие полученной пробы требованиям набора ПЦР или другого процесса (например, электрофорез, или генетический анализ) обязательно проводится измерение. К сожалению, большинство лабораторий игнорируют этот этап и работают вслепую. «Золотой стандарт» ПЦР в случае положительной реакции свидетельствует о наличии искомого ДНК, но в случае отрицательной реакции нельзя с уверенностью интерпретировать это как отрицательный результат, поскольку низкое количество ДНК, высокое содержание белка,



полисахаридов и ингибиторов в пробе могут демонстрировать ложно-отрицательные результаты. Отсутствие измерения может частично компенсироваться внесением положительного внутреннего контроля выделения в каждую пробу. Но далеко не все наборы предоставляют такую возможность. Для оптимизации пробы, не соответствующей условиям тестирования описаны различные методы, но наиболее удобными из них являются концентрирование выпариванием (высушиванием) при низкой концентрации и разведение элюирующим раствором при высокой концентрации ДНК и белка. Если после повторного измерения проба снова не соответствует заявленным требованиям, необходимо начать экстракцию с самого начала, возможно даже с забора новой биологической пробы.

### **Обсуждение и выводы**

Таким образом, процесс экстракции ДНК состоит из ряда этапов на каждом из которых возможны определённые трудности. Поэтому необходимо, в первую очередь, проконтролировать отбор соответствующей пробы согласно правилам *Good Laboratory Practice*. Выбор наиболее оптимального для данного исследования метода экстракции и набора для выделения является важной составляющей для корректной диагностики бактерий, вирусов, мутаций и ГМО. Выполнение каждым оператором требований протокола, указанного на вкладыше к набору очень важно. Неправильная экстракция нуклеиновых кислот отражается на результатах исследования и часто повышает риск ложно-отрицательной реакции. Невыполнение правил биобезопасности, напротив, может привести к загрязнению, контаминации пробы и, соответственно, ложно-положительному результату. В связи с этим, необходимо учитывать важность каждого компонента в цепочке элементов экстрагирования и возможные оплошности от момента определения цели и метода исследования до измерения и оценки качества полученной пробы. Только в этом случае лаборатория может гарантировать правильность результатов своих исследований.

### **ЛИТЕРАТУРА**

1. Антонова О. и др. Эффективные методы выделения нуклеиновых кислот для проведения анализов в молекулярной биологии (обзор). Научное приборостроение. 2010, Т.20, № 1, с. 3-9
2. *Emílio César Martins Pereira*. The potential for infectious disease contamination during the artificial insemination procedure in swine. In Tech Open, India, 2012, pp.118-199
3. Handbook. Good laboratory practice (GLP). WHO, 2009, pp.39-40

4. *LB Pinto et al.* Investigation of Influenza A, West Nile and Newcastle Disease Viruses in Birds from the Pantanal Wetlands of Mato Grosso, Brazil. *Brazilian Journal of Poultry Science* Apr./June 2016, on-line version
5. QIAcube Qiagene. User manual. 2018, 164 p.
6. Thermo Fisher Scientific. Reference-Guide. DNA purification and analysis, 2017, 52 p.