СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ИЗ СУХИХ ПЯТЕН КРОВИ

Седых А.В.[1], Сайтгалина М.А.[1], Останкова Ю.В.[1], Тотолян Арег А.[1, 2]

[1]ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия
[2]ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Неонатальный скрининг – обязательная процедура обследования новорожденных, которая позволяет выявить наличие генетических заболеваний. Для массового обследования детей используют сухие пятна крови. Эта технология является наиболее доступной и удобной для транспортировки и хранения биологического материала. Выделение ДНК – один из важных этапов в молекулярной диагностике, точность которого особенно важна при генетическом анализе. Различные наборы для экстракции ДНК предлагают различные протоколы и реагенты, которые могут отличаться по эффективности и качеству выделения.

Целью нашей работы было проведение сравнительного анализа наборов реагентов для экстракции ДНК из сухих пятен крови.

Материалом служили образцы сухой капли крови на картах Гатри, полученные от здоровых доношенных младенцев на 3-4 день жизни в рамках программы скрининга новорожденных.

Методы исследования включали спектрофотометрический анализ для определения концентрации и чистоты ДНК, оценивали также простоту протоколов, продолжительность выделения, возможность автоматизации процесса. Контроль эффективности экстракции ДНК разными наборами реагентов дополнительно осуществляли по результатам ПЦР в режиме реального времени с применением тест-системы для оценки уровней TREC и KREC в периферической крови, так как количественный анализ требует большей внимательности к исследуемому материалу.

При оценке чистоты НК, экстрагированных с использованием всех четырех анализируемых наборов, можно было наблюдать успешную депротеинизацию образцов ДНК и относительную чистоту. Средняя чистота ДНК для набора «Экстра-ДНК-Био» составила 2,2±0,23, для «ЭКСТРА-преп PS» – 1,89±0,23, для «МагноПрайм ЮНИ» при ручном и автоматическом выделении – 2,31±0,21 и 2,85±0,09 соответственно. Средняя концентрация ДНК для набора «Экстра-ДНК-Био» составила 15,28 мкг/мл, для «ЭКСТРА-преп PS» – 16,26 мкг/мл, для «МагноПрайм ЮНИ» при ручном и автоматическом выделении – 62,5 мкг/мл и 102,28 мкг/мл, соответственно. Согласно примененному критерию Краскела–Уоллиса и тесту Данна, значимые различия и по параметру TREC, и по параме-

Адрес для переписки:
Седых Анна Васильевна
ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера»
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14.
Тел.: 8 (812) 233-20-92.
E-mail: ann_sedykh@mail.ru

Address for correspondence:
Anna V. Sedykh
Saint Petersburg Pasteur Institute
14 Mira St
St. Petersburg
197101 Russian Federation
Phone: +7 (812) 233-20-92.
E-mail: ann_sedykh@mail.ru

Образец цитирования:
А.В. Седых, М.А. Сайтгалина, Ю.В. Останкова, Арег А. Тотолян «Сравнительный анализ наборов реагентов для выделения ДНК из сухих пятен крови» // Медицинская иммунология, 2023. Т. 25, № 6. С. 1453-1462. doi: 10.15789/1563-0625-CAO-2895

© Седых А.В. и соавт., 2023
Эта статья распространяется по лицензии Creative Commons Attribution 4.0

For citation:
A.V. Sedykh, M.A. Saitgalina, Yu.V. Ostankova, Areg A. Totolian "Comparative analysis of reagent kits for DNA extraction from dry blood stains", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2023, Vol. 25, no. 6, pp. 1453-1462.
doi: 10.15789/1563-0625-CAO-2895

© Sedykh A.V. et al., 2023
The article can be used under the Creative Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-CAO-2895

тру KREC присутствуют между группой образцов ДНК, экстрагированных с использованием набора реагентов «МагноПрайм ЮНИ» при ручном выделении, с группами образцов, экстрагированных другими способами («МагноПрайм ЮНИ» при автоматическом выделении) или наборами «Экстра-ДНК-Био» и «ЭКСТРА-преп PS».

В ходе настоящего исследования четыре сравниваемых набора реагентов продемонстрировали высокий уровень сходимости полученных данных, удовлетворяя всем необходимым параметрам для проведения дальнейшего молекулярно-генетического анализа, могут быть использованы для неонатального скрининга и в других областях исследований, требующих экстракции ДНК из сухой капли крови.

Ключевые слова: неонатальный скрининг, сухие пятна крови, выделение ДНК, первичные иммунодефициты, TREC, KREC

COMPARATIVE ANALYSIS OF REAGENT KITS FOR DNA EXTRACTION FROM DRY BLOOD STAINS

Sedykh A.V.[a], Saitgalina M.A.[a], Ostankova Yu.V.[a], Totolian Areg A.[a, b]

[a] *Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation*
[b] *First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation*

Abstract. Neonatal screening is a mandatory newborn screening procedure that detects the presence of genetic diseases. Dry blood stains are used for mass screening of children. This technology is the most affordable and convenient for the transportation and storage of biological material. DNA extraction is one of the important steps in molecular diagnostics, the accuracy of which is particularly important in genetic analysis. Different DNA extraction kits offer different protocols and reagents, which may vary in efficiency and quality of extraction.

The aim of our work was to perform a comparative analysis of reagent kits for DNA extraction from dried blood spots.

The materials were dried blood drop samples on Guthrie cards obtained from healthy preterm infants on day 3-4 of life as part of a newborn screening program.

The study methods included spectrophotometric analysis to determine the concentration and purity of DNA, the simplicity of protocols, the duration of isolation, and the possibility of automating the process were also evaluated. The efficiency of DNA isolation using different reagent kits was additionally monitored by real-time PCR results using a test system to assess the level of TREC and KREC in peripheral blood, since quantitative analysis requires more attention to the material under study.

In assessing the purity of the nucleic acid extracted using four kits analyzed, successful deproteinization of DNA samples and relative purity could be observed. The average DNA purity for the "Extra-DNA-Bio" set was 2.2±0.23, for "EXTRA-prep PS" – 1.89±0.23, for "MagnoPrime UNI" with manual and automatic isolation – 2.31±0.21 and 2.85±0.09, respectively. The average DNA concentration for the Extra-DNA-Bio kit was 15.28 μg/mL, for the EXTRA-Prep PS kit it was 16.26 μg/mL, and for the MagnoPrime UNI for manual and automated isolation it was 62.5 μg/mL and 102.28 μg/mL, respectively. According to the applied Kraskell-Wallis criterion and Dunn's test, significant differences in both TREC and KREC parameters are present between the group of DNA samples extracted using the "MagnoPrime UNI" reagent kit for manual extraction and the groups of samples extracted by other methods ("MagnoPrime UNI" for automatic extraction) or "Extra-DNA-Bio" and "EXTRA-Prep PS" kits.

In the course of the present study, four comparable reagent sets demonstrated a high level of convergence of the obtained data, satisfying all the necessary parameters for further molecular genetic analysis, can be used for neonatal screening and in other areas of research requiring DNA extraction from a dried blood spots.

Keywords: neonatal screening, dried blood spots, DNA isolation, primary immunodeficiencies, TREC, KREC

Введение

На сегодняшний день в России, как и во многих других странах, неонатальный скрининг является обязательной процедурой для всех новорожденных. Главная цель программ массового обследования – выявить редкие генетически-детерминированные заболевания [3]. С 2023 г. список патологий, на которые проводят неонатальный скрининг в России, расширен на 29 но-

зологий, включая нарушения обмена веществ, спинально мышечную атрофию, а также группу первичных иммунодефицитов (ПИД), связанных с отсутствием или снижением уровней Т- и/или В-лимфоцитов в периферической крови. В настоящее время ведутся работы не только по расширению перечня заболеваний, которые можно выявить при скрининге, но и по улучшению методов диагностики и лечения этих заболеваний [2, 5]. Так, например, мультиплексный анализ определения концентрации молекул Т-рецепторных эксцизионных колец (англ. T cell receptor excision circles – TREC) и Каппа-делеционных рекомбинационных эксцизионных колец (англ. kappa-deleting recombination excision circles – KREC), представляющих собой небольшие кольцевые фрагменты эписомальной ДНК, образующиеся при перестройке Т-клеточного и В-клеточного рецепторов, соответственно, позволяет идентифицировать детей с ПИД, проявляющимися Т- и (или) В-клеточными лимфопениями [10, 13].

Основным подходом при скрининге новорожденных является прямая диагностика, которая заключается в непосредственном обнаружение мутаций в определенных генах. На данный момент проводят определение ряда мутаций в генах *CYP21OHB, CFTR, GALT, SMN1, PAH, TSH* α- и β-субъединиц, а также количественную оценку уровней молекул TREC и KREC в периферической крови [7, 8, 9, 11, 13, 14, 18]. Выбор метода молекулярной диагностики определяется спецификой исследуемой мутации и включает как метод ПЦР, так и более сложные ДНК-методы.

В соответствии с приказом МЗРФ от 22.03.2006 г. № 185 «О массовом обследовании новорождённых детей на наследственные заболевания», образцы крови новорожденных получают в виде сухих пятен крови на картах Гатри (DBS – dry blood spot) [4]. Для младенцев данная технология считается безопасной и менее травматичной, чем взятие цельной венозной крови. Биологический материал в виде сухой капли крови имеет преимущества в транспортировке и хранении. Так, доставляются карты Гатри в герметичной упаковке при температуре от минус 20 до плюс 37 °С, а хранятся многие годы при температуре от плюс 18 до плюс 25 °С. ДНК, выделенная из таких образцов, остается пригодной по своим качественным и количественным характеристикам для генетического анализа, что является необходимым критерием для быстрого и информативного скрининга [6]. Таким образом, неонатальный скрининг проводят, используя методику экстракции ДНК из сухих пятен крови с последующим молекулярно-генетическим анализом.

Точность диагностики во многом зависит не только от постановки ПЦР-анализа, но также от условий взятия, транспортирования и хранения клинического материала. Еще одним значимым для качества и результата анализа этапом является выделение нуклеиновых кислот. Экстракция ДНК – это важная стадия генетического анализа, поскольку качество и количество выделенной ДНК напрямую влияют на точность и достоверность результатов [6]. Различные наборы для выделения ДНК могут варьировать по составу реагентов, условиям экстракции, методам очистки. Было показано что, при комнатной температуре эффективность выделения ДНК из цельной крови на 68% выше, чем из сухих пятен крови [15]. Со временем стабильность экстрагированной ДНК из образцов цельной крови значительно падает, в то время как качество ДНК, выделенной из DBS, остается прежним [17]. Тем не менее следует отметить, что ДНК, экстрагированная из DBS, выходит менее чистой из-за примесей в бумаге, чем ДНК, полученная из замороженной цельной крови [15]. В РФ представлено относительно небольшое количество наборов реагентов, предназначенных для выделения ДНК из сухих пятен крови, по сравнению с количеством наборов для получения ДНК из цельной крови. Возникает необходимость подбора наиболее доступного, качественного и наименее затратного по времени способа экстракции ДНК.

Целью нашей работы было проведение сравнительного анализа наборов реагентов для экстракции ДНК из сухих пятен крови.

Материалы и методы

В работе использовали 30 образцов сухой капли крови на картах Гатри, полученных от здоровых доношенных младенцев на 3-4 день жизни в рамках программы скрининга новорожденных. Все процедуры соответствовали этическими стандартами институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и её последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. Дизайн исследования был одобрен локальным этическим комитетом ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера». Исследования проводили при письменном согласии родителей пациентов.

Для сравнительного анализа использовали ряд коммерческих наборов реагентов для выделения нуклеиновых кислот: «Экстра-ДНК-Био» («Алкор-био», Россия), «МагноПрайм ЮНИ» (ФБУН ЦНИИЭ, Россия), «ЭКСТРА-преп PS» (ФБУН НИИ им. Пастера, Россия). В каждом случае экстракцию ДНК осуществляли согласно инструкциям производителя без изменений или с некоторыми модификациями. Процесс экс-

тракции ДНК с использованием набора «МагноПрайм ЮНИ» (ООО «НекстБио», Россия) был разделен на автоматическое и ручное выделение. При машинном выделении использовали прибор KingFisher Flex 24 (Thermo Scientific, США).

Пробоподготовку осуществляли следующим способом: в реакцию выделения ДНК брали 6 выбитых из DBS дисков диаметром 3 мм, полученных с использованием панчера DBS Puncher (PerkinElmer, Финлядия). Для каждого образца обойму/пул дисков готовили в четырех повторах, исходя из числа анализируемых наборов для экстракции ДНК.

Определение концентрации и чистоты ДНК

Концентрацию и чистоту ДНК измеряли на приборе NanoDrop One (Thermo Scientific, США). Соотношение A260/A280 показывало значение чистоты выделенной ДНК. Значения концентрации определяли при длине волны 280 нм. В качестве контроля использовали буфер для элюции ДНК, соответствующий каждому набору. Каждый образец измеряли трижды. Измерения проводили при комнатной температуре после достаточного перемешивания образцов.

Оценка эффективности выделения ДНК

Оценку эффективности выделения ДНК определяли методом ПЦР в режиме реального времени с гибридизационно-флуорсцентной детекцией с использованием набора реагентов TREC/KREC-AMP PS (ФБУН НИИ Пастера, Россия) [13]. ПЦР проводили на амплификаторе планшетного типа с функцией детекции флуоресценции в режиме реального времени по каналам FAM/Green, HEX/Yellow, Cy5/Red, ROX/Orange (CFX96, США). Эффективность экстракции оценивали по уровню молекул TREC и KREC на 10^5 клеток в параллелях выделения с использованием разных наборов.

Статистический анализ

Статистическую обработку данных проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prizm 5 и Microsoft Excel 2010. Для оценки статистически значимых межгрупповых различий в уровнях анализируемых молекул (TREC и KREC) применяли критерий Краскела–Уоллиса и тест Данна.

Результаты и обсуждение

При сравнительном анализе наборов учитывали несколько критериев: эффективность экстракции ДНК, концентрацию и чистоту ДНК, простоту методики, продолжительность выделения, а также возможность автоматизации процесса. В качестве эталонного набора/набора сравнения использовали коммерческий набор реагентов «Экстра-ДНК-Био» («Алкор-био», Россия), получивший медицинское РУ в России, предназначенный для экстракции ДНК из сложных образцов, включая сухие пятна крови, и обеспечивающий эффективный выход ДНК. В двух исследованных наборах для выделения ДНК – референсном «Экстра-ДНК-Био» («Алкор-био», Россия) и «ЭКСТРА-преп PS» (ФБУН НИИ им. Пастера, Россия) – агрегация нуклеиновых кислот (НК) основана на их спиртовом осаждении после этапа лизиса клеточных мембран. В протоколе работы набора реагентов «МагноПрайм ЮНИ» (ООО «НекстБио», Россия) на биологический образец воздействуют лизирующим раствором в присутствии частиц магнитного сорбента. После деструкции клеточных мембран, растворенные НК связываются с частицами магнетизированной силики, и, после отмывки других компонентов лизата, элюируются в буферный раствор. Оба подхода зарекомендовали себя как достаточно простые методы выделения ДНК, удобные для рутинной лабораторной практики, поскольку не требуют больших затрат времени для получения чистого препарата ДНК, в том числе при работе с цельной кровью. Однако, при необходимости использования карт Гатри, как в случае неонатального скрининга, важно учитывать эффективность очистки препарата ДНК от волокон, попадающих с бумажных фильтров, и возможное влияние этих волокон на результат анализа. Полученные данные представлены в таблице 1.

Эффективность выделения показывает, насколько качественно и точно была проведена экстракция ДНК. Данный критерий зависит от многих факторов, таких как пробоподготовка, метод выделения, полученная концентрация и чистота ДНК. Эффективность выделения набора «ЭКСТРА-преп PS» (ФБУН НИИ им. Пастера, Россия) была близка к значениям выбранного нами эталонного набора «Экстра-ДНК-Био» («Алкор-био», Россия). Набор «МагноПрайм ЮНИ» (ФБУН ЦНИИЭ, Россия) показал значительную разницу выхода ПЦР-продукта и отличался от эталонного в 2-3 раза. Такое различие в данных можно объяснить разными принципами экстракции, применяемыми в наборах, основанных на сорбции НК магнитных частицах, и наборах, использующих щелочную экстракцию с поэтапным удалением примесей. Известно, что магнитные частицы обладают большой связывающей способностью к нуклеиновым кислотам, что позволяет минимизировать потери выхода ДНК [1]. Получение высокой концентрации при выделении набором «МагноПрайм ЮНИ» (ФБУН ЦНИИЭ, Россия) также может влиять на эффективность ПЦР. Несмотря на разный выход НК, продукты ПЦР образуются во всех случаях

ТАБЛИЦА 1. СРАВНЕНИЕ НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ЭКСТРАКЦИИ ДНК ИЗ СУХИХ ПЯТЕН КРОВИ

TABLE 1. COMPARISON OF REAGENT KITS FOR DNA EXTRACTION FROM DRIED BLOOD SPOTS

Параметры сравнения Comparison parameters	**Экстра-ДНК-Био («Алкор-био», Россия)** Extra-DNA-Bio, (Alcor-bio, Russia)	**ЭКСТРА-преп PS (ФБУН НИИ им. Пастера, Россия)** EXTRA-prep PS (Saint Petersburg Pasteur Institute)	**МагноПрайм ЮНИ (ручное выделение) (ФБУН ЦНИИЭ, Россия)** MagnoPrime UNI (manual extraction) (CRIE, Russia)	**МагноПрайм ЮНИ (автомат) (ФБУН ЦНИИЭ, Россия)** MagnoPrime UNI (automatic) (CRIE, Russia)
Эффективность анализа уровней TREC/KREC Efficiency of TREC/KREC level analysis	1 / 1	0,95 / 1,01	3,86 / 7,16	2,10 / 3,08
Чистота ДНК* DNA purity	2,2±0,23	1,89±0,23	2,31±0,21	2,85±0,09
Концентрация ДНК* DNA concentration*	**15,28 мкг/мл** 15.28 μg/mL	**16,26 мкг/мл** 16.26 μg/mL	**62,5 мкг/мл** 62.5 μg/mL	**102,28 мкг/мл** 102.28 μg/mL
Количество этапов Number of steps	4	4	5	5
Продолжительность выделения Duration of extraction	**39 минут** 39 minutes	**39 минут** 39 minutes	**20 минут + 31 минуту пробоподготовка** 20 minutes + 31 minutes sample preparation	**40 минут + пробоподготовка 31 минуту** 40 minutes + 31 minutes sample preparation
Продолжительность выделения из расчета на 30 образцов Duration of extraction per 30 samples	**65 минут** 65 minutes	**65 минут** 65 minutes	**75 минут** 75 minutes	**40 минут + пробоподготовка 31 минуту** 40 minutes + 31 minutes sample preparation
Автоматизация Automation	–	–	+	

Примечание. * – средняя чистота/концентрация ДНК, полученной при экстракции.

Note. *, average purity/concentration of DNA obtained by extraction.

выделения в достаточном количестве, необходимом для анализа полученных данных.

Нуклеиновые кислоты имеют максимум поглощения при длине волны 260 нм, большинство белков – при 280 нм. Отношение 260 нм к 280 нм является показателем соотношения ДНК и белков в образце. Для чистых образцов ДНК соотношение оптических плотностей полученных при измерении 260 нм и 280 нм должно быть в диапазоне 1,8-2. Значения отношения 260/280 нм меньше 1,8 означает значительное присутствие в образце белков или других молекул [16]. Кроме того, остаточные примеси использовавшихся в ходе экстракции веществ, таких как фенол или этанол, также снижают отношение А260 к А280. В связи с этим остаточное химическое загрязнение в результате процедуры выделения нуклеиновых кислот может привести к ложному завышению концентрации нуклеиновых кислот при анализе. Качество ДНК решающим образом влияет на эффективность амплификации в ходе последующей ПЦР. На обнаружение и, тем более, количественный анализ специфических участков ДНК может отрицательно сказаться фрагментация нуклеиновых кислот на этапе экстракции и применение веществ, способных ингибировать ПЦР. Кроме того, химические реагенты, используемые в процедуре выделения, способны сохраняться в виде загрязнителей. При оценке чистоты НК, экстрагированных с использованием всех четырех анализируемых наборов, можно было наблюдать успешную депротеинизацию образцов ДНК и относительную чистоту. Полученное значение чистоты ДНК, выделенной реагентами «ЭКСТРА-преп PS» (ФБУН НИИ им. Пастера, Россия) соответствовало всем требованиям по этому критерию. Однако в образцах, выделенных набором «МагноПрайм ЮНИ» (ФБУН ЦНИИЭ, Россия) ручным способом и набором «Экстра-ДНК-Био» («Алкор-био», Россия) зна-

чения чистоты находились в интервале от 2-2,3, что указывает на незначительные уровни загрязнения. Величина больше 1,9 может означать наличие РНК в пробе. Примеси, присутствующие в образцах, выделенные реагентами «МагноПрайм ЮНИ» (ФБУН ЦНИИЭ, Россия) на автоматической станции, можно объяснить тем, что магнитные частицы хорошо выделяют как ДНК, так и РНК, в то время как другие наборы предназначены для выделения только ДНК. Чистота ДНК, полученной при помощи наборов с ионообменниками, может превышать границу из-за присутствия в пробе как ДНК, так и РНК.

Концентрация выделенной НК может зависеть от времени обработки и состава буферных растворов на этапах лизиса и денатурации. Во всех проанализированных наборах мы получили концентрацию необходимую для проведения ПЦР-анализа. Максимальная концентрация ДНК была показана для автоматического выделения набором «МагноПрайм ЮНИ» (ФБУН ЦНИИЭ, Россия) и в среднем была равна 102,28 нг/мкл. Длительная пробоподготовка при экстракции НК реагентами «МагноПрайм ЮНИ» (ФБУН ЦНИИЭ, Россия) может влиять на больший выход ДНК, чем при выделении другими наборами.

С одной стороны, большое количество ДНК приводит к высокому уровню фоновой флуоресценции и/или неспецифическому образованию продуктов при ПЦР-РВ, что ведет к низкой эффективности ПЦР и получению ложных результатов. С другой стороны, использование малых концентраций ДНК ведет к разному количеству стартовых молекул в пробе, и при количественном анализе сотрудникам будет сложно оценить полученные данные [12]. На начальном этапе исследования важно определить концентрацию ДНК после выделения и оптимизировать ее уровень, исходя из дальнейших целей исследования.

В связи с вышесказанным, контроль эффективности экстракции нуклеиновых кислот разными наборами реагентов дополнительно осуществляли по результатам ПЦР в режиме реального времени, проведенной с каждой полученной ДНК-пробой, с применением тест-системы TREC/KREC-AMP PS (ФБУН НИИ Пастера, Россия). Набор реагентов для ПЦР-диагностики TREC/KREC-AMP PS позволяет амплифицировать в экстрагированной суммарной ДНК-пробе два эндогенных внутренних контроля. Одним из них является ген фермента пуринового обмена эукариот – гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы человека (HPRT), локализованный на длинном плече Х-хромосомы. Вторым внутренним контролем реакции является ген белковой субъединицы p30 рибонуклеазы P (RPP30), локализованный на хромосоме 10. Два этих гена относят к так называемым генам домашнего хозяйства, работа которых необходима для жизнеобеспечения клетки, и для которых характерно постоянство представленности и экспрессии в разных клетках организма. Два эндогенных внутренних контроля позволяют оценить качество очистки образца ДНК в ходе его экстракции от интерферирующих веществ и ингибиторов ПЦР.

Тем не менее для оценки влияния способа выделения ДНК на конечный результат анализа нельзя опираться только на пороговый цикл Cq при амплификации контрольных генов, поскольку даже при соблюдении всех рекомендаций по пробоподготовке карт Гатри, количество клеток, попадающих в анализ, разнится от пробы к пробе. Набор реагентов для ПЦР-диагностики TREC/KREC-AMP PS позволяет рассчитывать количество ДНК-молекул TREC и KREC в суммарной экстрагированной ДНК-пробе, приходящихся на 10^5 клеток крови. Такой подход позволяет учитывать количество клеток, попадающих в пробирку при выделении ДНК.

Таким образом, оценка эффективности экстракции ДНК разными наборами реагентов, с применением тест-системы TREC/KREC-AMP PS позволяет оценить качество очистки ДНК-препаратов и сравнить результат ПЦР-анализа с учетом количества исходного материала и ошибок пипетирования на всех этапах анализа. Целесообразность использования набора TREC/KREC-AMP PS для оценки качества выделения ДНК с карт Гатри обусловлена еще и тем, что количественный анализ эксцизионных колец TREC и KREC с 2023 года входит в программу неонатального скрининга на территории России. При этом в ходе скрининга оценку уровней TREC и KREC осуществляют, используя кровь новорожденных, нанесенную на карты Гатри.

В ходе исследования для одного и того же биологического материала (сухого пятна крови на карте Гатри) ПЦР-анализ проводили четыре раза с использованием ДНК-проб, выделенных четырьмя разными способами/наборами. Таким образом, для одного новорожденного получали четыре значения уровня молекул TREC и четыре значения уровня молекул KREC в крови. Количественный результат определялся только системой выделения, поскольку все остальные этапы анализа для всех образцов были идентичными.

В реакциях со всеми образцами, независимо от протокола выделения, наблюдали нарастание флуоресцентных сигналов от двух генов внутреннего контроля, что говорит об эффективности очистки препарата от ингибиторов всеми четырьмя использованными наборами/способами. На рисунках 1 и 2 изображены диаграммы сравнения уровней TREC и KREC, соответственно, в

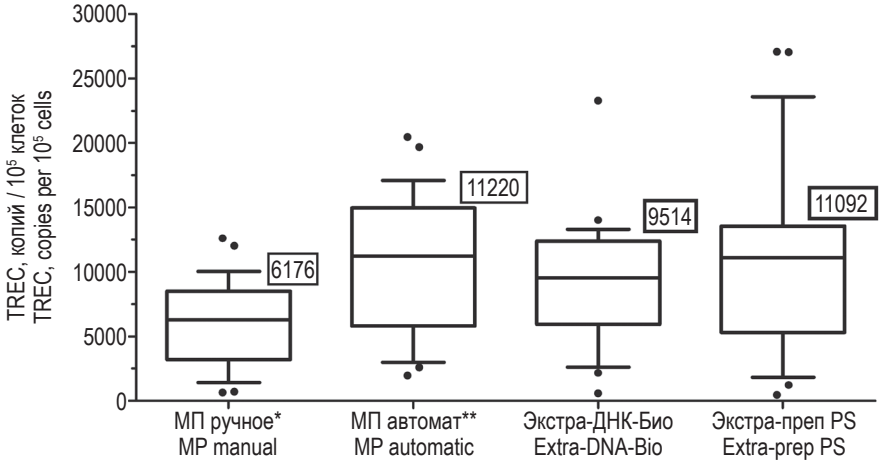

Рисунок 1. Диаграмма сравнения уровней молекул TREC в группах ДНК-образцов, выделенных разными наборами/способами

Примечание. Числами обозначены медианные значения TREC в группе. * – «МагноПрайм ЮНИ» ручное выделение, ** – «МагноПрайм ЮНИ» автоматическое выделение.

Figure 1. Diagram comparing the levels of TREC molecules in groups of DNA samples isolated by different kits/methods

Note. Numbers indicate median TREC values in the group. *, "MagnoPrime UNI" manual extraction, **, "MagnoPrime UNI" automatic extraction.

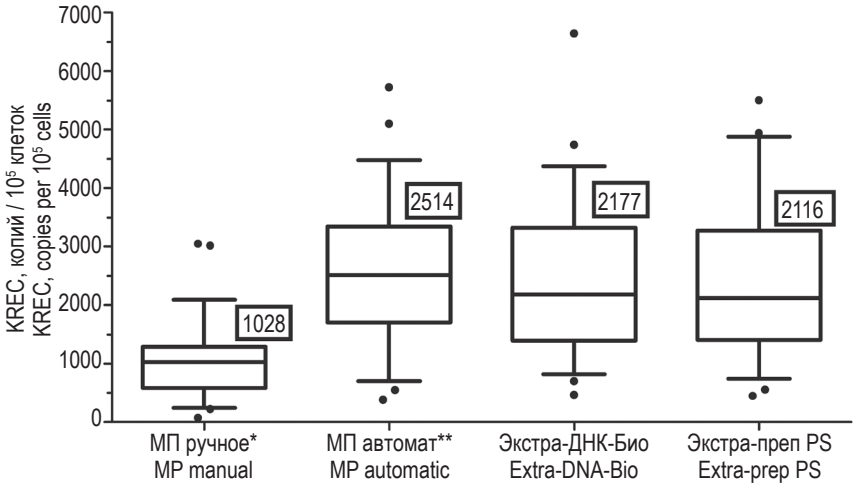

Рисунок 2. Диаграмма сравнения уровней молекул KREC в группах ДНК-образцов, выделенных разными наборами/способами

Примечание. Числами обозначены медианные значения KREC в группе. * – «МагноПрайм ЮНИ» ручное выделение, ** – «МагноПрайм ЮНИ» автоматическое выделение.

Figure 2. Diagram comparing the levels of KREC molecules in groups of DNA samples isolated by different kits/methods

Note. Numbers indicate median KREC values in the group. *, "MagnoPrime UNI" manual extraction, **, "MagnoPrime UNI" automatic extraction.

разных группах образцов ДНК, с указанием медианного значения в группе.

В таблицах 2 и 3 указаны минимальные, медианные и максимальные уровни TREC и KREC, соответственно, в разных группах ДНК-образцов, а также значения p-value при обнаружении статистически значимых различий в уровнях аналитов между группами.

Таким образом, согласно примененному критерию Краскела–Уоллиса и тесту Данна, значимые различия и по параметру TREC, и по параметру KREC присутствуют между группой образцов ДНК, экстрагированных с использованием набора реагентов «МагноПрайм ЮНИ» при ручном выделении, с группами образцов, экстрагированных другими способами («МагноПрайм ЮНИ» при автоматическом выделении) или наборами «Экстра-ДНК-Био» и «ЭКСТРА-преп PS».

В качестве отдельного критерия следует рассматривать количество образцов, экстракция которых может осуществляться единовременно. В большинстве случаев количество проб определяется количеством ячеек в центрифуге. Как правило, в лабораториях используют центрифу-

ТАБЛИЦА 2. УРОВНИ МОЛЕКУЛ TREC В КРОВИ НОВОРОЖДЕННЫХ ПРИ ВЫДЕЛЕНИИ ДНК РАЗНЫМИ НАБОРАМИ РЕАГЕНТОВ

TABLE 2. LEVELS OF TREC MOLECULES IN NEONATAL BLOOD DURING DNA EXTRACTION WITH DIFFERENT REAGENT KITS

	Уровень молекул TREC, копий/10^5 копий Level of TREC molecules, copies/10^5 copies			
	МагноПрайм ЮНИ (ручное выделение) MagnoPrime UNI (manual extraction)	**МагноПрайм ЮНИ (автоматическое выделение)** MagnoPrime UNI (automatic extraction)	**Экстра-ДНК-Био** Extra-DNA-Bio	**ЭКСТРА-преп PS** EXTRA-prep PS
	1	**2**	**3**	**4**
Minimum	643,7	1954	557,4	436,5
25% Percentile	2990	5811	5944	5278
Median	6176	11220	9514	11092
75% Percentile	8489	14967	12405	13542
Maximum	12598	20456	23272	27074

Примечание. Значения p-value при наличии значимых различий: $p_{1-2} = 0{,}0010$; $p_{1-3} = 0{,}0061$; $p_{1-4} = 0{,}0058$.
Note. p-values in the presence of significant differences: $p_{1-2} = 0.0010$; $p_{1-3} = 0.0061$; $p_{1-4} = 0.0058$.

ТАБЛИЦА 3. УРОВНИ МОЛЕКУЛ KREC В КРОВИ НОВОРОЖДЕННЫХ ПРИ ВЫДЕЛЕНИИ ДНК РАЗНЫМИ НАБОРАМИ РЕАГЕНТОВ

TABLE 3. LEVELS OF KREC MOLECULES IN NEONATAL BLOOD DURING DNA EXTRACTION WITH DIFFERENT REAGENT KITS

	Уровень молекул KREC, копий/10^5 копий Level of KREC molecules, copies/10^5 copies			
	МагноПрайм ЮНИ (ручное выделение) MagnoPrime UNI (manual extraction)	**МагноПрайм ЮНИ (автоматическое выделение)** MagnoPrime UNI (automatic extraction)	**Экстра-ДНК-Био** Extra-DNA-Bio	**ЭКСТРА-преп PS** EXTRA-prep PS
	1	**2**	**3**	**4**
Minimum	72,90	379,7	459,8	443,1
25% Percentile	580,6	1698	1393	1409
Median	1028	2514	2177	2116
75% Percentile	1288	3342	3316	3273
Maximum	3047	5716	6637	5497

Примечание. Значения p-value при наличии значимых различий: $p_{1-2} < 0{,}0001$; $p_{1-3} < 0{,}0001$; $p_{1-4} < 0{,}0001$.
Note. p-values in the presence of significant differences: $p_{1-2} < 0.0001$; $p_{1-3} < 0.0001$; $p_{1-4} < 0.0001$.

ги на 12 или 24, в редких случаях на 48 образцов. С количеством образцов в работе и с количеством ячеек в центрифуге связана продолжительность экстракции ДНК, так как оператор, осуществляющий процесс, проводит длительные этапы, не имеющие конкретной протяженности времени, указанной в инструкции. В связи с вышесказанным, метод ручного выделения занимает больше времени, а максимальное количество образцов не может превышать 48. Такие наборы как «МагноПрайм ЮНИ» (ФБУН ЦНИИЭ, Россия) имеют существенное преимущество за счет возможности при использовании автоматических станций выделения экстрагировать ДНК из большого количества проб за короткое время. Как правило, масштаб работ в научных целях и в целях клинико-лабораторной диагностики сильно отличается. Чаще всего необходимость таких объемов возникает в лабораторной диагностике при большой рутинной загрузке.

При молекулярно-генетических исследованиях во время неонатального скрининга качество и целостность ДНК имеет большое значение для достоверности результатов. Значительное количество способов экстракции нуклеиновых кислот из различного биологического материала, включая сухую каплю крови, использующиеся в практике научных лабораторий для получения ДНК высокой концентрации и чистоты, например, методы на основе фенола и хлороформа, обычно

трудно стандартизируемы и требуют много времени, что усложняет применение таких методов в рутинной лабораторной диагностике. В этом контексте коммерческие наборы удобны и для научных, и для рутинно-диагностических исследований, поскольку просты в использовании и имеют стандартизированные экономящие время протоколы.

Заключение

В ходе настоящего исследования все четыре набора реагентов для экстракции ДНК из сухой капли крови продемонстрировали высокий уровень сходимости полученных данных, удовлетворяя всем необходимым параметрам для проведения дальнейшего молекулярно-генетического анализа. Различия в показателях могут быть связаны с особенностями наборов и не являются существенными. Наборы «МагноПрайм ЮНИ» (ФБУН ЦНИИЭ, Россия), «ЭКСТРА-преп PS» (ФБУН НИИ им. Пастера, Россия), «Экстра-ДНК-Био» («Алкор-био», Россия) позволяют получить ДНК надлежащего качества и чистоты для проведения информативного неонатального скрининга, а также могут быть использованы в других областях исследований, требующих экстракции ДНК из сухой капли крови. Указанные наборы могут успешно применяться в практике лабораторной диагностики с одинаковым уровнем информативности и надежности.

Финансирование исследования

Работа не имела финансовой поддержки.

Список литературы / References

1. Аукенов Н.Е., Масабаева М.Р., Хасанова У.У. Выделение и очистка нуклеиновых кислот. Состояние проблемы на современном этапе // Наука и здравоохранение, 2014. № 1. С. 51-53. [Aukenov N.E., Masabaeva M.R., Hasanova U.U. Isolation and purification of nucleic acids. State of the problem at the present stage. *Nauka i zdravoohranenie = Science and Healthcare, 2014, no. 1, pp. 51-53*. (In Russ.)]

2. Воронин С.В., Куцев С.И. Неонатальный скрининг на наследственные заболевания в России: вчера, сегодня, завтра // Неонатология: Новости. Мнения. Обучение, 2022. Т. 10, № 4. С. 34-39. [Voronin S.V., Kutsev S.I. Neonatal screening for hereditary diseases in Russia: yesterday, today, and tomorrow. *Neontalogia: Novosti. Mneniya. Obuchenie = Neonatology: News, Opinions, Training, 2022, Vol. 10, no. 4, pp. 34-39*. (In Russ.)]

3. Габдуллина Д.М., Усенова О.П., Моренко М.А., Ковзель Е.Ф. Первичные иммунодефициты: современные подходы в диагностике и терапии // Клиническая медицина Казахстана, 2016. № 1. С. 12-15. [Gabdullina D.M., Ussenova O.P., Morenka M.A., Kovzel E.F. Primary immunodeficiency: modern approaches to diagnosis and therapy. *Clinicheskaya meditsina Kazakhstana = Clinical Medicine of Kazakhstan*, *2016, no. 1, pp. 12-15*. (In Russ.)]

4. Григорьев К.И., Харитонова Л.А., Радзинский В.Е., Папышева О.В., Котайш Г.А. Перинатальная медицина и проблемы неонатального скрининга // Медицинская сестра, 2017. № 4. С. 3-9. [Grigoryev K.I., Kharitonova L.A., Radzinsky V.E., Papysheva O.V., Kotaish G.A. Perinatal medicine and problems of newborn screening. *Meditsinskaya sestra = Nurse*, *2017, no. 4, pp. 3-9*. (In Russ.)]

5. Дерябина С.С., Тузанкина И.А., Власова Е.В., Болков М.А., Шершнёв В.Н. Неонатальный скрининг на тяжелую комбинированную иммунную недостаточность в России: прекрасное далеко или завтрашняя реальность? // Вопросы современной педиатрии, 2017. Т. 16, № 1. С. 59-66. [Deryabina S.S., Tuzankina I.A., Vlasova E.V., Bolkov M.A., Shershnev V.N. Neonatal screening for severe combined immune deficiency in Russia: Glorious future or tomorrow's reality? *Voprosy sovremennoy pediatrii = Issues of Modern Pediatrics*, *2017, Vol. 16, no. 1, pp. 59-66*. (In Russ.)]

6. Долудин Ю.В., Лимонова А.С., Козлова В.А., Ефимова И.А., Борисова А.Л., Мешков А.Н., Покровская М.С., Драпкина О.М. Сбор и хранение ДНК-содержащего биоматериала и выделенной ДНК // Кардиоваскулярная терапия и профилактика, 2020. Т. 19, № 6. С. 196-204. [Doludin Yu.V., Limonova A.S., Kozlova V.A., Efimova A.I., Borisova A.L., Meshkov A.N., Pokrovskaya M.S., Drapkina O.M. Collection and storage of DNA-containing biomaterial and isolated DNA. *Kardiovasculyarnaya terapia i profilaktika = Cardiovascular Therapy and Prevention*, *2020, Vol. 19, no. 6, pp. 196-204.* (In Russ.)]

7. Карева М.А., Орлова Е.М. Адреногенитальный синдром: прошлое, настоящее и будущее // Проблемы эндокринологии, 2011. Т. 57, №. 1. С. 66-70. [Kareva M.A., Orlova E.M. Adrenogenital syndrome: past, present, and future. *Problemy endokrinologii = Problems of Endocrinology*, *2011, Vol. 57, no. 1, pp. 66-70.* (In Russ.)]

8. Лепесова М.М., Ушакова Т.С., Мырзалива Б.Д. Дифференциальная диагностика спинальной мышечной амиотрофии первого типа // Наука о жизни и здоровье, 2016. № 1. С. 38-46. [Lepessova M.M., Ushakova T.S., Myrzaliyeva B.D. Differential diagnosis of the spinal muscular amyotrophy type one. *Nauka o zhizni i zdorovie = Life and Health Science*, *2016, no. 1, pp. 38-46.* (In Russ.)]

9. Никифорова А.И., Абрамов Д.Д., Зобкова Г.Ю., Горяинова А.В., Семыкин С.Ю., Шубина Е., Донников А.Е., Трофимов Д.Ю. Определение мутаций гена CFTR у детей с муковисцидозом // Вестник Российского государственного медицинского университета, 2018. № 3. С. 35-41. [Nikiforova A.I., Abramov D.D., Zobkova G.Y., Goriainova A.V., Semykin S.Y., Shubina J., Donnikov A.E., Trofimov D.Y. Detection of CFTR mutations in children with cystic fibrosis. *Vestnik Rossiiskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta = Bulletin of Russian State Medical University*, *2018, no. 3, pp. 35-41*. (In Russ.)]

10. Образцов И.В., Фёдорова Л.А., Продеус А.П., Кудлай Д.А., Корсунский И.А. Референсные значения концентрации TREC и KREC у детей и подростков в возрасте 1-17 лет // Педиатрия им. Г. Н. Сперанского,

2021. Т.100, № 6. С. 38-45. [Obraztsov L.A. Fedorova A.P. Prodeus D.A. Kudlay I.A. Korsunsky. Reference values for the concentration of TREC and KREC in children aged 1-17 years. *Pediatria. Zhurnal im. G.N. Speransky = Pediatry. Journal n. a. G.N. Speransky, 2021, Vol. 100, no. 6, pp. 38-45.* (In Russ.)]

11. Петеркова В.А., Безлепкина О.Б., Ширяева Т.Ю., Вадина Т.А., Нагаева Е.В., Чикулаева О.А., Шредер Е.В., Конюхова М.Б., Макрецкая Н.А., Шестопалова Е.А., Митькина В.Б. Клинические рекомендации «Врожденный гипотиреоз» // Проблемы эндокринологии, 2022. Т. 68, № 2. С. 90-103. [Peterkova V.A., Bezlepkina O.B., Shiryaeva T.U., Vadina T.A., Nagaeva E.V., Chikulaeva O.A., Shreder E.V., Konuhova M.B., Makretskaya N.A., Shestopalova E.A., Mitkina V.B. Clinical guideline of "Congenital hypothyroidism". *Problemi endokrinologii = Problems of Endocrinology, 2022, Vol. 68, no. 2, pp. 90-103.* (In Russ.)]

12. Ребрик*ов* Д.В., Трофимов Д.Ю. ПЦР «В реальном времени»: подходы к анализу данных (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология, 2006. Т. 42, № 5. С. 520-528. [Rebrikov D.V., Trofimov D.Yu. Real-time PCR: a review of approaches to data analysis. *Prikladnaya biokhimiya i microbiologia = Applied Biochemistry and Microbiology*, *2006, Vol. 42, no. 5, pp. 520-528.* (In Russ.)]

13. Сайтгалина М.А., Останкова Ю.В., Любимова Н.Е., Семенов А.В., Кузнецова Р.Н., Тотолян А.А. Модифицированный метод количественного определения уровней TREC и KREC в периферической крови у больных с иммунодефицитными состояниями // Инфекция и иммунитет, 2022. Т. 12, № 5. С. 981-996. [Saitgalina M.A., Ostankova Y.V., Liubimova N.E., Semenov A.V., Kuznetsova R.N., Totolian A.A. Modified quantitative approach for assessing peripheral blood TREC and KREC levels in immunodeficient patients. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, *2022, Vol. 12, no. 5, pp. 981-996.* (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-MMF-2039.

14. Anderson S. GALT deficiency galactosemia. *MCN Am. J. Matern. Child Nurs., 2018, Vol. 43, no. 1, pp. 44-51.*

15. Choi E.H., Lee S.K., Ihm C., Sohn Y.H. Rapid DNA extraction from dried blood spots on filter paper: potential applications in biobanking. *Osong Public Health and Res. Perspect., 2014, Vol. 5, no. 6, pp. 351-357.*

16. Lucena-Aguilar G., Sanchez-Lopez A.M., Barberan-Aceituno C., Carrillo-Ávila J.A., Lopez-Guerrero J.A., Aguilar-Quesada R. DNA Source Selection for Downstream Applications Based on DNA Quality Indicators Analysis. *Biopreserv. Biobank., 2016, Vol. 14, no. 4, pp. 264-270.*

17. Mas S., Crescenti A., Gasso P., Vidal-Taboada J.M., Lafuente A. DNA cards: determinants of DNA yield and quality in collecting genetic samples for pharmacogenetic studies. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol., 2007, Vol. 101, no. 2, pp. 132-137.*

18. Nikiforova A.I., Abramov D.D., Kadochnikova V.V., Zobkova G.U., Ogurtsova K.A., Brjuhanova N.O., Shestopalova E.A., Kochetkova T.O., Shubina E.S., Donnikov A.E., Trofimov D.Y. Determining the frequency of PAH mutations in Moscow region residents with phenylketonuria using a combination of real-time PCR and next-generation sequencing. *Bulletin of Russian State Medical University, 2017, no. 4, pp. 38-44.*

Авторы:

Седых А.В. *— младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия*

Сайтгалина М.А. *— младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия*

Останкова Ю.В. *— к.б.н., заведующая лабораторией иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия*

Тотолян Арег А. *— д.м.н., профессор, академик РАН, заведующий лабораторией молекулярной иммунологии, директор ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера»; заведующий кафедрой иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия*

Authors:

Sedykh A.V., *Junior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federatio*

Saitgalina M.A., *Junior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation*

Ostankova Yu.V., *PhD (Biology), Head, Laboratory of Immunology and Virology HIV, Senior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation*

Totolian Areg A., *PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Molecular Immunology, Director, Saint Petersburg Pasteur Institute; Head, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation*

Поступила 08.08.2023
Принята к печати 18.08.2023

Received 08.08.2023
Accepted 18.08.2023