


СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СПОСОБОВ ЭКСТРАКЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

В.Е. Ведерников, к.б.н., Лаборатория молекулярной диагностики ООО «Вега» ГК «Алкор Био»

 чувствительность полимеразной цепной реакции (ПЦР) в значительной степени зависит от эффективности выделения ДНК из клинического материала. Недостаток информации об особенностях различных методов пробоподготовки и отсутствие утвержденных требований к наборам для экстракции нуклеиновых кислот (НК) может привести к затруднениям при выборе методики для решения конкретной задачи.

В настоящее время для диагностики наследственных и инфекционных заболеваний широко используется метод ПЦР. Одним из ключевых моментов эффективной молекулярно-генетической диагностики является этап пробоподготовки. Соблюдение выработанных годами клинико-диагностической практики требований к каждой процедуре этого этапа крайне необходимо для получения достоверных результатов. Чувствительность метода ПЦР в значительной степени зависит от эффективности выделения ДНК из клинического материала. На данный момент наиболее востребованными в клинической практике методами экстракции ДНК являются: сорбционный метод, метод на основе спиртового осаждения и экспресс-метод экстракции ДНК. Каждый из перечисленных подходов имеет свои достоинства и недостатки. К сожалению, выбор того или иного метода пробоподготовки основан, прежде всего, на таких его характеристиках, как стоимость, продолжительность и трудоемкость анализа, а не на соответствии выбранной методики поставленной задаче. Это связано с отсутствием доступной аналитической информации в этой области и четких утвержденных рекомендаций по пробоподготовке.

Методы экстракции

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 клеточных 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* [1], *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 [2]. Это связано с тем, что в процессе пробоподготовки экспресс методом не производится очищение препарата НК от посторонних примесей и концентрирования в малом объеме, что, в совокупности приводит к значительному снижению чувствительности анализа.

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

Применение. В большей степени данная методика подходит для молекулярно-генетических исследований, когда требуется

лишь качественный анализ, а не определение наличия целевой последовательности инфекционного агента.

Образцы. Для проведения анализа подходят образцы только с низким содержанием ингибиторов, такие как урогенетальные соскобы, мазки, слюна и др.

Спиртовое осаждение — в основе методики лежит агрегация НК в присутствии 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 подсушивается 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 изопропанол, 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°C). 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 [3].

При выделении малых количеств НК (менее 100 нг) для визуализации осадка и улучшения процесса преципитации рекомендуется использовать соосадители, такие как гликоген, линейный полиакрилоамид или декстран [4]. В некоторых протоколах экстракции предлагается добавлять соосадители непосредственно к этанолу или изопропанолу [5]. Делать этого, однако, не следует, так как соосадитель, попадая непосредственно в спирт, начинает образовывать центры нуклеации в отсутствие НК и, соответственно, при последующем смешивании с образцом в меньшей степени способствует агрегации НК. Соосадитель, таким образом, следует добавлять непосредственно в лизирующий буфер или к образцу.

На предпоследнем этапе выделения ДНК проводится добавление 70% этанола для отмывки осадка от остатков солей. Важно, чтобы отмывка проводилась именно водным раствором спирта, так как соли хорошо растворяются в воде и в гораздо меньшей степени в спирте. Кроме того, использование 70% этанола препятствует переходу НК в водную фазу.

На завершающем этапе процедуры происходит растворение НК в водном буфере обычно при температуре 56-65°C и вортексировании.

Применение. Данная методика подходит как для молекулярно-генетических исследований, так и для диагностики инфекционных заболеваний. Однако, в силу продолжительности и сложности анализа метод спиртового осаждения получил наибольшее распространение в исследовательских молекулярно-генетических лабораториях и в судебно-медицинских лабораториях, где требуется выделение аналитических количеств ДНК.

Образцы. Для проведения процедуры можно использовать широкий спектр биологических образцов, однако спиртовое осаждение приводит к преципитации не только НК, но и белков, что в свою очередь затрудняет получение чистого препарата НК из образцов с высоким содержанием белков, таких как биоптаты или цельная кровь. Наиболее простым путем решения проблемы с нежелательными примесями является уменьшение объема анализируемого образца, однако такой подход не применим, если необходимо получить результат с максимальной чувствительностью.

Сорбционная экстракция — методика, в основе которой лежит избирательная сорбция на поверхности силики в присутствии хаотропной соли. Ингибиторы и другие компоненты клинического материала остаются в растворе. С помощью центрифугирования силика с НК осаждается, а супернатант с 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, ван-дер-ваальсовы 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]. Среди существующих точек зрения на процесс взаимодействия ДНК с силикой можно выделить несколько основных.

Первая точка зрения [7] состоит в том, что сорбция ДНК на силике происходит за счёт образования катионных мостиков между силанольными группами, расположенными на поверхности силики, и фосфатными группами ДНК.

Вторая точка зрения опирается на свойства хаотропных агентов [8]. Известно, что молекула НК в растворе покрыта гидратной оболочкой. Попадая в раствор, молекулы хаотропной соли активно разрушают водородные связи, присоединяя к себе воду. В итоге молекула ДНК, лишённая своей гидратной оболочки, становится гидрофобной. То же самое происходит с поверхностью силики. В итоге между ДНК и силикой возникают гидрофобные взаимодействия, и идёт процесс сорбции.

Согласно еще одной точке зрения [9,10] основным механизмом взаимодействия ДНК и силики является образование водородных связей между водой и молекулами НК. Подобные выводы были сделаны после выявления зависимости между количеством адсорбированной ДНК и диаметром пор силики. В данной теории не ясным остаётся роль хаотропных солей, присутствующих в растворе. Вследствие этого наиболее вероятными вариантами механизма сорбции представляются первые два, которые являются взаимодополняющими.

Необходимо также отметить, что процесс сорбции лучше всего идет при высокой ионной силе раствора, показателях pH 3,5-6,5 (оптимум pH 5) и температуре выше 37°C [11].

На завершающем этапе процедуры выделения (элюции) в условиях низкой ионной силы раствора происходит высвобождение НК с поверхности силики. Большое значение здесь имеет pH раствора — ДНК лучше элюируется и сохраняет свою целостность при pH 8-9, для РНК предпочтительнее pH 6-7.

Объем анализируемого образца. Метод сорбции позволяет эффективно выделять НК как из стандартных объемов клинического материала (например, 100 мкл урогенитального соскоба), так и из больших объемов биопроб — от 1 мл и более.

Применение. Данный метод подходит как для молекулярно-генетических исследований, так и для обнаружения различных инфекций с максимальной чувствительностью.

Образцы. Метод сорбции на силике позволяет качественно отмывать образец от всевозможных примесей, ингибиторов. Благодаря этому, данная методика является универсальной — она подходит для любых типов биопроб.

Разработки компании Алкор Био

В компании Алкор Био разрабатываются наборы для пробоподготовки на основе всех трех подходов к экстракции НК:

1. Набор для экспресс-выделения нуклеиновой кислоты на основе температурного лизиса, в состав которого введен дополнительный компонент — соосадитель ингибиторов, повышающий качество очистки образца в процессе центрифугирования.
2. Набор на основе спиртового осаждения мы адаптировали для выделения геномной ДНК из сухих пятен крови, которые используются при скрининге новорожденных.
3. Набор для выделения нуклеиновых кислот методом магнитоуправляемой сорбции на силике — наиболее интересная и перспективная разработка. Принципиальным отличием от классического протокола здесь является то, что в качестве сорбента используются магнитные частички, покрытые силикой. Это дает очень важное преимущество: промывать осадок можно без использования центрифуги, с использованием только магнитного штатива. Данный метод позволяет работать без дорогостоящего оборудования, а для проведения процедуры экстракции НК таким способом требуется значительно меньше времени, чем при использовании других методик. Важным преимуществом магнитоуправляемого выделения является возможность автоматизации процесса.

Компания Алкор Био разработала собственные магнитные частички, которые отличаются высоким качеством покрытия и соответствуют лучшим зарубежным аналогам. Эти частички выращиваются и затем определенным образом покрываются оболочкой силики, на которую в дальнейшем сорбируются НК.

Заключение

Одним из основных этапов проведения молекулярно-генетических исследований, основанных на методе ПЦР, является выделение ДНК. От выбранного метода выделения зависит чувствительность анализа и как следствие надежность и достоверность получаемых результатов.

Наиболее распространенным методом выделения ДНК в клинико-диагностических лабораториях для диагностики инфекций является экспресс экстракция. Это обусловлено низкой стоимостью анализа и простотой его исполнения. Однако, чувствительность данного подхода в ряде случаев недостаточна для применения с целью диагностики ИППП.

Метод спиртового осаждения, обладая высокой чувствительностью, не получил широкого распространения для диагностики ИППП в связи со сложностью и продолжительностью анализа. Тем не менее, этот метод является незаменимым для выделения аналитических количеств ДНК.

Универсальным подходом выделения ДНК является сорбционная экстракция, которая, наряду с высокой чувствительностью, характеризуется простотой исполнения. Более того, использование данного метода выделения НК позволит автоматизировать процесс, что особенно актуально для клинико-диагностических лабораторий с большим потоком исследований. Использование магнитных частиц собственного производства снижает стоимость анализа, что, как мы надеемся, будет способствовать широкому распространению этого наиболее эффективного и качественного метода выделения НК.

Ссылки на литературные источники сохраняются в издательстве и высылаются по просьбе читателей.