

Сравнительный анализ наборов для выделения нуклеиновых кислот из образцов крови и тканей животных

Кумар Н. А., Тарасова Д. А., Буханова А. А., Маралова Е. Д., Циммер О. Я., Илларионов Р. А., Ивашечкин А. А., Емельянова Н. Б., Махотенко А. В., Азарян В. Б., Снигирь Е. А., Мухин В. Е., Юдин В. С.

ФГБУ "Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью" ФМБА России. Москва, Россия

Цель. Провести сравнительный анализ эффективности коммерческих наборов для выделения дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) из крови и тканей, а также рибонуклеиновой кислоты (РНК) из тканей мышей, и оценить влияние постмортального интервала (ПМИ) на качество и количество извлекаемых нуклеиновых кислот (НК).

Материал и методы. Использовали образцы крови и тканей (мозг, сердце, печень, почки, легкие, мышцы, семенники) 12 мышей линии Balb/C. Забор материала проводили сразу (0 ч) и через 24 ч после эвтаназии. Для выделения ДНК протестировали 10 коммерческих наборов (российских и зарубежных), для выделения РНК — набор RNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия). Контроль качества включал измерение концентрации (флуориметрия), чистоты (спектрофотометрия) и целостности (электрофорез) НК.

Результаты. Наборы на основе спин-колонок (QIAamp DNA Blood Mini Kit, Qiagen, США, D-Blood-5) показали наивысший выход ДНК из крови. Для тканей наибольший выход ДНК обеспечили наборы на магнитных частицах (GM Tissue, Tissue M), но колоночный метод (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen, Германия) дал лучшие показатели чистоты и стабильности при увеличении ПМИ. Увеличение ПМИ до 24 ч привело к значительному снижению концентрации и целостности как ДНК, так и РНК во всех тканях, кроме семенников. Наиболее выраженная деградация РНК (падение индекса RIN (RNA integrity number, степень деградации РНК) до 2,5–2,8) наблюдалась в почках и мышцах.

Заключение. Эффективность выделения НК существенно зависит от типа набора, биоматериала и ПМИ. Выбор оптимального метода должен основываться на этих факторах. Полученные данные критически важны для планирования преаналитического этапа исследований.

Ключевые слова: ДНК, РНК, постмортальный интервал, качество нуклеиновых кислот, коммерческие наборы, мыши, ткани, кровь, RIN, DIN.

Отношения и деятельность: нет.

Поступила 03/09-2025

Рецензия получена 08/09-2025

Принята к публикации 22/09-2025



Для цитирования: Кумар Н. А., Тарасова Д. А., Буханова А. А., Маралова Е. Д., Циммер О. Я., Илларионов Р. А., Ивашечкин А. А., Емельянова Н. Б., Махотенко А. В., Азарян В. Б., Снигирь Е. А., Мухин В. Е., Юдин В. С. Сравнительный анализ наборов для выделения нуклеиновых кислот из образцов крови и тканей животных. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2025;24(11):4568. doi: 10.15829/1728-8800-2025-4568. EDN: PNPOAD

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

e-mail: rillarionov@cspfmbaru

[Кумар Н. А. — аналитик 2 категории лаборатории биобанкирования и мультиомиксных методов исследований, ORCID: 0000-0003-2225-8515, Тарасова Д. А. — аналитик лаборатории биобанкирования и мультиомиксных методов исследований, ORCID: 0000-0002-6996-8891, Маралова Е. Д. — аналитик лаборатории биобанкирования и мультиомиксных методов исследований, ORCID: 0009-0008-9095-7346, Циммер О. Я. — аналитик лаборатории биобанкирования и мультиомиксных методов исследований, ORCID: 0009-0008-4126-1801, Илларионов Р. А.* — аналитик 2 категории лаборатории биобанкирования и мультиомиксных методов исследований, ORCID: 0000-0003-2711-748X, Ивашечкин А. А. — аналитик 1 категории лаборатории биобанкирования и мультиомиксных методов исследований, ORCID: 0000-0002-0148-1112, Емельянова Н. Б. — к.б.н., зав. виварием, ORCID: 0000-0003-1920-0363, Махотенко А. В. — к.б.н., аналитик 1 категории лаборатории биобанкирования и мультиомиксных методов исследований, ORCID: 0000-0002-7894-9422, Азарян В. Б. — аналитик 2 категории лаборатории биобанкирования и мультиомиксных методов исследований, ORCID: 0009-0002-2757-8147, Снигирь Е. А. — к.б.н., руководитель лаборатории биобанкирования и мультиомиксных методов исследований, ORCID: 0000-0003-1245-7764, Мухин В. Е. — к.м.н., начальник управления экспериментальной биотехнологии и геномной инженерии, ORCID: 0000-0001-8973-7890, Юдин В. С. — к.б.н., директор института синтетической биологии и геномной инженерии, ORCID: 0000-0002-9199-6258].

Адреса организаций авторов: ФГБУ "Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью" ФМБА России, ул. Погодинская, д. 10, стр. 1, Москва, 119121, Россия.
Addresses of the authors' institutions: Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks of the Federal medical and biological agency, Pogodinskaya st., 10, bld. 1, Moscow, 119121, Russia.

A comparative analysis of kits for nucleic acid extraction from animal blood and tissue samples

Kumar N. A., Tarasova D. A., Bukhanova A. A., Maralova E. D., Zimmer O. Ya., Illarionov R. A., Ivashechkin A. A., Emelyanova N. B., Makhotenko A. V., Azaryan V. B., Snigir E. A., Mukhin V. E., Yudin V. S.

Center for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks. Moscow, Russia

Aim. To conduct a comparative analysis of the effectiveness of commercial kits for deoxyribonucleic acid (DNA) extraction from blood and tissue, as well as ribonucleic acid (RNA) from mouse tissue, and to evaluate the effect of the postmortem interval (PMI) on the quality and quantity of extracted nucleic acids (NA).

Material and methods. Blood and tissue samples (brain, heart, liver, kidneys, lungs, muscle, and testes) from 12 Balb/C mice were used. Samples were collected immediately (0 h) and 24 h after euthanasia. Ten commercial kits (Russian and international) were tested for DNA extraction, and the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Germany) was used for RNA extraction. Quality control included measuring the concentration (fluorometry), purity (spectrophotometry), and integrity (electrophoresis) of the DNA.

Results. Spin-column-based kits (QIAamp DNA Blood Mini Kit, Qiagen, USA, D-Blood-5) demonstrated the highest DNA yield from blood. For tissue, magnetic particle kits (GM Tissue, Tissue M) provided the highest DNA yield, but the column-based method (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen, Germany) yielded better purity and stability with increasing PMI. Increasing the PMI to 24 hours resulted in a significant decrease in the concentration and integrity of both DNA and RNA in all tissues except the testes. The most pronounced RNA degradation (a decrease in RNA integrity number to 2,5-2,8) was observed in the kidneys and muscles.

Conclusion. The efficiency of NA isolation significantly depends on the type of kit, biomaterial, and PMI. The selection of the optimal method should be based on these factors. The data obtained are critical for planning the preanalytical stage of the study.

Keywords: DNA, RNA, postmortem interval, nucleic acid quality, commercial kits, mice, tissue, blood, RIN, DIN.

Relationships and Activities: none.

Kumar N. A. ORCID: 0000-0003-2225-8515, Tarasova D. A. ORCID: 0009-0007-5479-4212, Bukhanova A. A. ORCID: 0000-0002-6996-8891, Maralova E. D. ORCID: 0009-0008-9095-7346, Zimmer O. Ya. ORCID: 0009-0008-4126-1801, Illarionov R. A.* ORCID: 0000-0003-2711-748X, Ivashechkin A. A. ORCID: 0000-0002-0148-1112, Emelyanova N. B. ORCID: 0000-0003-1920-0363, Makhotenko A. V. ORCID: 0000-0002-7894-9422, Azaryan V. B. ORCID: 0009-0002-2757-8147, Snigir E. A. ORCID: 0000-0003-1245-7764, Mukhin V. E. ORCID: 0000-0001-8973-7890, Yudin V. S. ORCID: 0000-0002-9199-6258.

*Corresponding author:
rillarionov@cpsfmba.ru

Received: 03/09-2025

Revision Received: 08/09-2025

Accepted: 22/09-2025

For citation: Kumar N. A., Tarasova D. A., Bukhanova A. A., Maralova E. D., Zimmer O. Ya., Illarionov R. A., Ivashechkin A. A., Emelyanova N. B., Makhotenko A. V., Azaryan V. B., Snigir E. A., Mukhin V. E., Yudin V. S. A comparative analysis of kits for nucleic acid extraction from animal blood and tissue samples. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2025;24(11):4568. doi: 10.15829/1728-8800-2025-4568. EDN: PNPOAD

ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота, НК — нуклеиновая кислота, ПМИ — постмортальный интервал, РНК — рибонуклеиновая кислота, DIN — DNA Integrity Number (степень деградации ДНК), RIN — RNA Integrity Number (степень деградации РНК).

Введение

Молекулярно-генетические исследования требуют качественного выделения нуклеиновых кислот (НК), что является критически важным этапом любого анализа. Выбор оптимального метода экстракции зависит от множества факторов, в т.ч. простоты, скорости, возможности автоматизации и стоимости процедуры [1].

Современные наборы для выделения НК представлены широким ассортиментом, различающимися по составу реактивов, протоколам обработки материалов и эффективностью выделения [2]. На выход НК влияет принцип работы и качество реактивов самого набора, тип ткани, из которого происходит экстракция, а также условия отбора биологического материала [1, 3].

Помимо вышеуказанных причин, на концентрацию и качество выделенных НК влияет постмортальный интервал (ПМИ) — период времени между наступлением смерти и моментом, когда проводится исследование или консервация биоматериала. После смерти дезоксирибонуклеиновая (ДНК) и рибо-

нуклеиновая (РНК) кислоты разрушаются нуклеазами, присутствующими в клетках организма или во внешних источниках (бактерии или другие загрязнители окружающей среды) [4]. В зависимости от органа, из которого выделяются НК, скорость деградации различается, например, в поджелудочной железе и печени из-за повышенного содержания рибонуклеазы деградация РНК происходит быстрее, чем в мозге, где наблюдается высокая стабильность РНК после смерти [5]. В живом организме деградация НК контролируется механизмами репарации, которые останавливаются после смерти [6], таким образом для планирования преаналитического этапа исследования следует четко регламентировать ПМИ, в течение которого необходимо заложить биоматериал на хранение или начать экстракцию НК.

Настоящее исследование направлено на проведение сравнительного анализа эффективности коммерческих наборов для выделения ДНК из крови и тканей, а также РНК из тканей мышей, и оценить влияние ПМИ на качество и количество извлекаемых НК.

Ключевые моменты

Что известно о предмете исследования?

- Качество выделения дезоксирибонуклеиновой и рибонуклеиновой кислот критически зависит от метода и типа биоматериала. После смерти животного нуклеиновые кислоты (НК) деградируют с разной скоростью в разных тканях.
- Существует множество коммерческих наборов для выделения НК, различающихся по принципу работы (магнитные частицы, спин-колонки) и эффективности.

Что добавляют результаты исследования?

- Прямое сравнение 10 наборов на одном материале выявило лидеров: для крови — колоночные наборы от производителей Qiagen (Германия) и Биолабмикс (Россия), для тканей — наборы GM Tissue (Биолабмикс, Россия) (максимальный выход) и QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Германия) (стабильность при автолизе).
- 24-часовой постмортальный интервал серьезно снижает количество и качество НК во всех тканях, кроме семенников. Наибольшая деградация рибонуклеиновой кислоты обнаружена в почках и мышцах.

Key messages

What is already known about the subject?

- The quality of deoxyribonucleic and ribonucleic acid extraction critically depends on the method and type of biomaterial. After death, nucleic acids (NA) degrade at different rates in different tissues.
- Numerous commercial RNA extraction kits exist, varying in their operating principles (magnetic particles, spin columns) and efficiency.

What might this study add?

- A direct comparison of 10 kits using the same material revealed the following leaders: for blood, column kits from Qiagen (Germany) and Biolabmix (Russia); for tissue, the GM Tissue kits (Biolabmix, Russia) (maximum yield) and the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Germany) (stable during autolysis).
- A 24-hour postmortem interval significantly reduces the quantity and quality of RNA in all tissues except the testes. The greatest degradation of RNA was found in the kidneys and muscles.

Материал и методы

Сбор биоматериала. Для отбора образцов использовали 12 мышей, самцов линии Balb/C, возрастом 7-9 нед. В виварии мышей содержали в системах индивидуально вентилируемых клеток на стандартном рационе, в контролируемом микроклимате.

Животных разделили на 2 группы по 6 голов в каждой. Эвтаназия проводилась методом цервикальной дислокации. Отбор биологического материала проводили сразу после эвтаназии (0 часов) и спустя сутки (24 ч). В течении суток тушки животных хранились при комнатной температуре (+20 ... +22 °C), что позволяет воссоздать условия внезапной гибели экспериментального животного, от которого необходимо провести забор материала.

Для отбора образцов крови проводили декапитацию. Кровь собирали в вакутейнеры с K₂-ЭДТА, аликвотировали в криопробирки и помещали на хранение при -20 °C. НК выделяли из печени, сердца, почек, легких, скелетных мышц, мозга, семенников. Часть тканей помещали в пустые маркированные криопробирки, которые сразу помещали в жидкий азот на долгосрочное хранение для дальнейшего выделения ДНК, остальную часть тканей помещали в криопробирки, содержащие раствор РНК-стабилизатора RNA-protect Tissue Reagent (Qiagen, Германия), после чего инкубировали при температуре +4 °C в течение 20 ч, удаляли раствор, а затем криопробирку с тканью помещали в жидкий азот для долгосрочного хранения.

Работу с лабораторными животными проводили в соответствии с Правилами лабораторной практики

в Российской Федерации (Приказ Минздрава России от 23.08.2010г № 706н) и правилами, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей ETS № 123 (Страсбург, 18.03.1986г).

Выделение НК. Для сравнительного анализа проводили выделение ДНК из образцов крови, выделение ДНК и РНК из образцов тканей мышей. Для выделения ДНК были протестированы 10 коммерческих российских и зарубежных наборов, для выделения РНК из образцов тканей использовали только набор RNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия) (таблица 1). В каждом случае выделение НК проводили вручную согласно протоколу производителя с обязательным контролем качества после завершения процедуры.

Контроль качества выделенных НК. Концентрацию ДНК измеряли флуориметрически на приборе Quantus (Promega Corporation, США) с помощью набора реагентов Quantifluor ONE dsDNA System (Thermo Fisher Scientific Inc., США), концентрацию РНК — на флуориметре Qubit (Thermo Fisher Scientific Inc., США) с помощью набора реагентов Qubit RNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Оценку показателей чистоты A260/A230 и A260/A280 проводили на приборе NanoDrop 8000 (Thermo Fisher Scientific, США). Оценку показателей целостности НК (DIN — степень деградации ДНК, RIN — степень деградации РНК) выполняли с помощью системы автоматического электрофореза 4200 TapeStation (Agilent Technologies, США), с использованием наборов реагентов Genomic DNA Reagents (Agilent Technologies, США), High Sensitivity D5000 Reagents (Agilent Technologies, США) для

Таблица 1

Краткая характеристика протестированных наборов для выделения НК

№	Название набора	Принцип выделения	Производитель	Страна производителя	Тип биоматериала	Тип НК
1	QIAamp DNA Blood Mini Kit	Колоночный метод	Qiagen	Германия	Кровь	ДНК
2	MagMAX DNA Multi-Sample Kit	Магнитные частицы	Thermo Fisher Scientific Inc	США	Кровь и др.	ДНК
3	PrepFiler Forensic DNA Extraction Kit	Магнитные частицы	Applied Biosystems	США	Кровь и др.	ДНК
4	M-Сорб	Магнитные частицы	Синтол	Россия	Кровь, ткани млекопитающих и др.	ДНК
5	MagAttract HMW DNA Kit	Магнитные частицы	Qiagen	Германия	Кровь	ДНК
6	D-Blood-5	Колоночный метод	Биолабмикс	Россия	Кровь и др.	ДНК
7	MagBlood-5	Магнитные частицы	Биолабмикс	Россия	Кровь	ДНК
8	QIAamp DNA Mini Kit	Колоночный метод	Qiagen	Германия	Ткань млекопитающих и др.	ДНК
9	GM Tissue	Магнитные частицы	Raissol Bio	Россия	Ткань млекопитающих и др.	ДНК
10	Tissue M	Магнитные частицы	Raissol Bio	Россия	Ткань млекопитающих и др.	ДНК
11	RNeasy Mini Kit	Колоночный метод	Qiagen	Германия	Ткань млекопитающих и др.	РНК

Примечание: ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота, НК — нуклеиновая кислота, РНК — рибонуклеиновая кислота.

Таблица 2

Сравнительная характеристика параметров выделенной ДНК в зависимости от набора, M±SD

Название набора	Концентрация ДНК, нг/мкл	A260/280	A260/230	Средняя продолжительность процедуры, мин
QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Германия)	10,40±10,42	1,84±0,09	0,51±0,26	45
D-Blood-5 (Биолабмикс)	8,75±3,56	1,86±0,12	0,42±0,05	55
MagAttract HMW DNA Kit (Qiagen, Германия)	5,56±1,53	1,85±0,05	2,55±0,64	30
MagBlood-5 (Биолабмикс, Россия)	5,38±1,71	1,84±0,05	0,37±0,01	70
PrepFiler Forensic DNA Extraction Kit (Applied Biosystems, США)	0,83±0,34	2,13±0,09	0,18±0,20	215
M-Сорб (Синтол, Россия)	0,26±0,02	1,64±0,07	0,23±0,14	90
MagMAX DNA Multi-Sample Kit (Thermo Fisher Scientific, США)	0,45±0,61	1,59±0,58	0,09±0,13	170

Примечание: M±SD — среднее ± стандартное отклонение; ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота.

ДНК и набора реагентов RNA ScreenTape Assay (Agilent Technologies, США) для РНК.

Статистическая обработка. Статистический анализ полученных данных проводили при помощи R 4.5.1 используя оболочку RStudio (Version: 2025.05.01 Build 513 | Released: 2025-06-01, Posit Software, PBC). Для сравнения групп применяли непараметрический критерий Вилкоксона для независимых выборок и однофакторный дисперсионный анализ с поправкой на множественные сравнения. Для визуализации полученных данных применяли пакет ggplot2.

Результаты

Выделение ДНК из образцов крови

Проведенный сравнительный анализ 7 коммерческих наборов для выделения ДНК из крови животных позволил выявить различия по ключевым параметрам контроля качества (таблица 2). Следует отметить, что ДНК, выделенная с использовани-

ем 3 наборов — PrepFiler Forensic DNA Extraction Kit (Applied Biosystems, США), M-Сорб (Синтол, Россия) и MagMAX DNA Multi-Sample Kit (Thermo Fisher Scientific, США), имела крайне низкие значения концентрации (<1 нг/мкл), что не позволило получить достоверные результаты для соотношений A260/230 и A260/280. Данные по качеству, полученные с использованием этих наборов, в дальнейшем сравнении не использовались.

Наборы D-Blood-5 (Биолабмикс, Россия) и QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Германия) продемонстрировали высокие показатели концентрации ДНК, незначительно превышая показатели, полученные для остальных наборов (рисунок 1). Также отметим, что для всех 4 наборов, при использовании которых концентрация всех выделенных образцов ДНК была >1 нг/мкл, получено оптимальное значение соотношения A260/280, на-

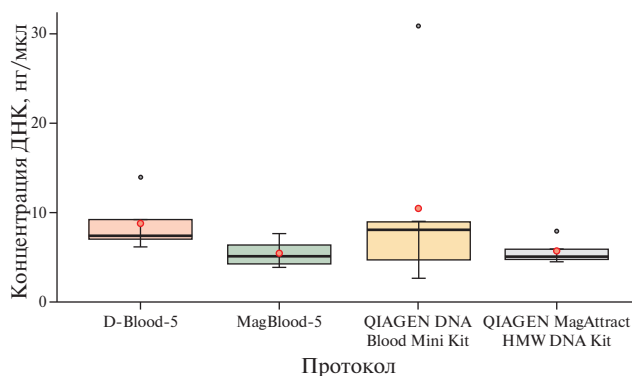


Рис. 1 Сравнение концентраций выделенной ДНК из образцов крови.

Примечание: ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота. Цветное изображение доступно в электронной версии журнала.

ходящееся в диапазоне ~1,8 [7]. Однако низкие показатели, полученные для соотношения A260/230, можно объяснить, с одной стороны, низкими значениями полученных концентраций, а с другой, — наличием дополнительных примесей различных органических соединений.

Для ряда образцов крови была проведена оценка показателя степени деградации ДНК (DIN) на представленных электрофореграммах образцов (рисунок 2). Отметим, что в результате выделения получены образцы высокомолекулярной ДНК с невысокой степенью деградации, что позволяет использовать полученную ДНК для проведения различных молекулярно-генетических анализов.

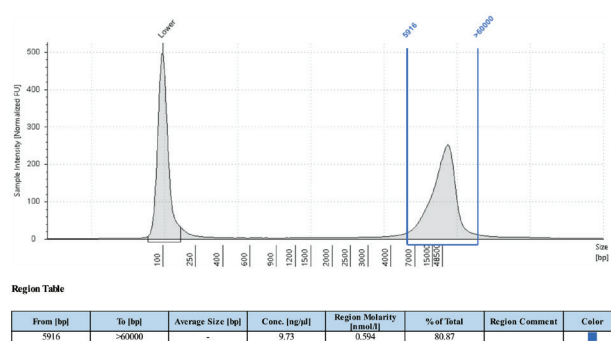
Особое внимание заслуживает параметр продолжительности выделения (таблица 1). Набор MagAttract HMW DNA Kit (Qiagen, Германия) показал наименьшее время обработки, что делает его предпочтительным для выполнения срочных исследований. Наибольшее время обработки потребовалось для выделения наборами PrepFile Forensic DNA Extraction Kit (Applied Biosystems, США) и MagMAX DNA Multi-Sample Kit (Thermo Fisher Scientific, США), при этом полученная ДНК отличается крайне низкими значениями концентрации.

Выделение ДНК из образцов тканей

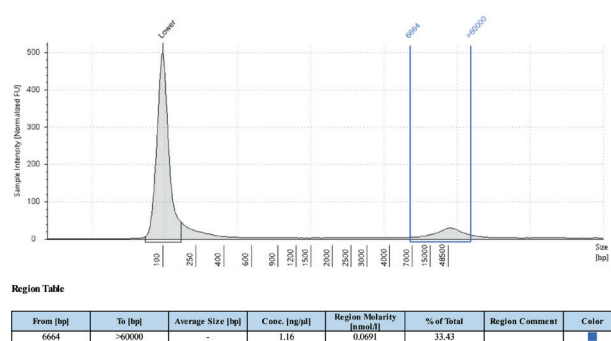
Выделение ДНК проводилось из контрольных (0 ч после эвтаназии) и опытных образцов тканей (24 ч после эвтаназии).

Для работы были использованы 3 коммерческих набора QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Германия), GM Tissue (Raissol Bio, Россия) и Tissue M (Raissol Bio, Россия). Согласно инструкции производителя набор Tissue M позволяет проводить выделения путем сорбции на магнитных частицах, а набор GM Tissue — классическим методом тотального спиртового осаждения НК. Набор от фирмы Qiagen предполагает проведение процедуры выделения с использованием спин-колонок.

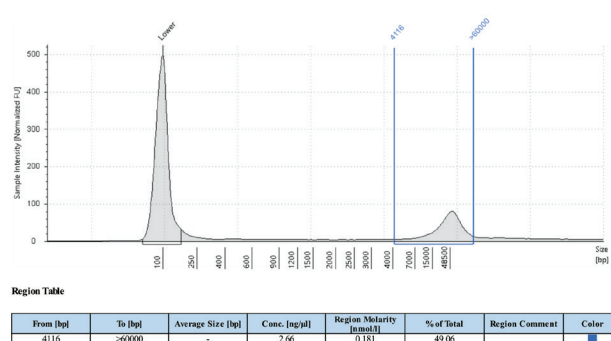
В случае работы с тканями животных наибольшие выходы концентрации ДНК получены при ис-



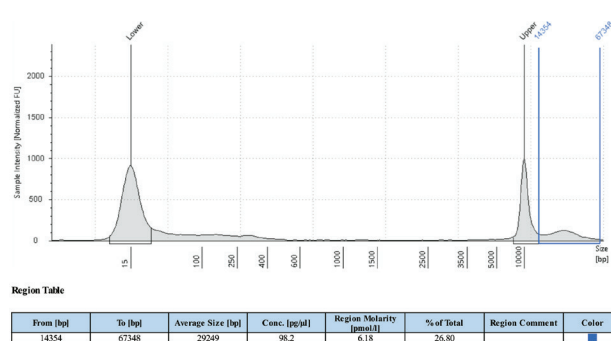
A



B



B



Г

Рис. 2 Электрофореграммы образцов выделенной геномной ДНК с использованием различных наборов: А. MagAttract HMW DNA Kit (Qiagen, Германия); Б. D-Blood-5 (Биолабмикс, Россия); В. MagBlood-5 (Биолабмикс, Россия); Г. QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Германия).

Примечание: ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота.

пользовании наборов GM Tissue (Raissol Bio, Россия) и Tissue M (Raissol Bio, Россия) для тканей сердца и скелетных мышц. Для остальных органов полу-

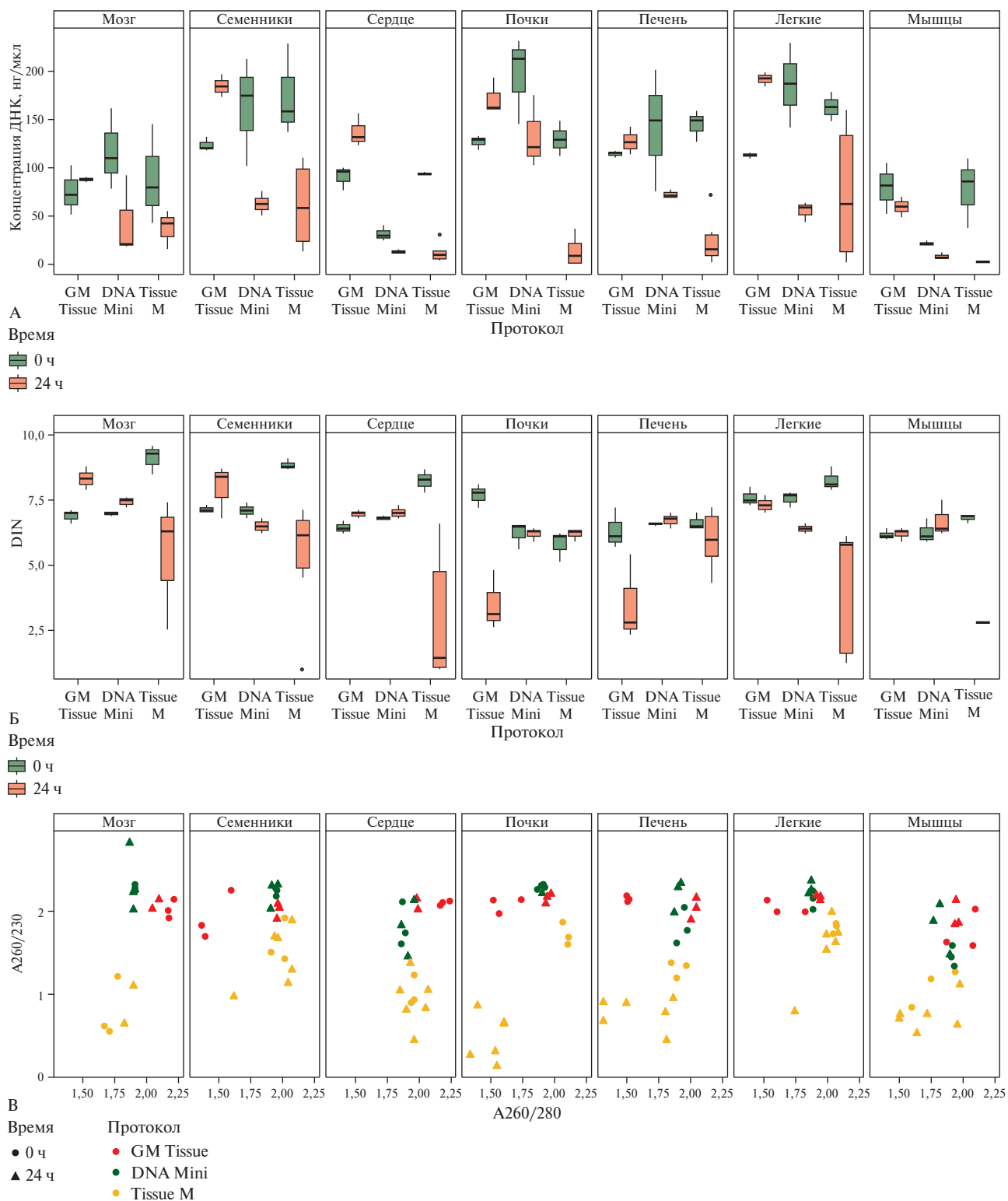


Рис. 3 А. Данные по концентрации выделенной ДНК, полученной с использованием 3 наборов; Б. Данные по степени деградации ДНК (DIN); В. Данные по соотношению A260/280 и A260/230.

Примечание: ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота, DIN — DNA Integrity Number (степень деградации ДНК). Цветное изображение доступно в электронной версии журнала.

ченные значения для всех трёх наборов не имеют достоверных различий. Также видно, что в течение 24 ч произошло значительное уменьшение количества

ДНК в тканях сердца, почек, печени и мышц при использовании набора Tissue M (Raissol Bio, Россия). Наименьшие различия концентрации в зави-

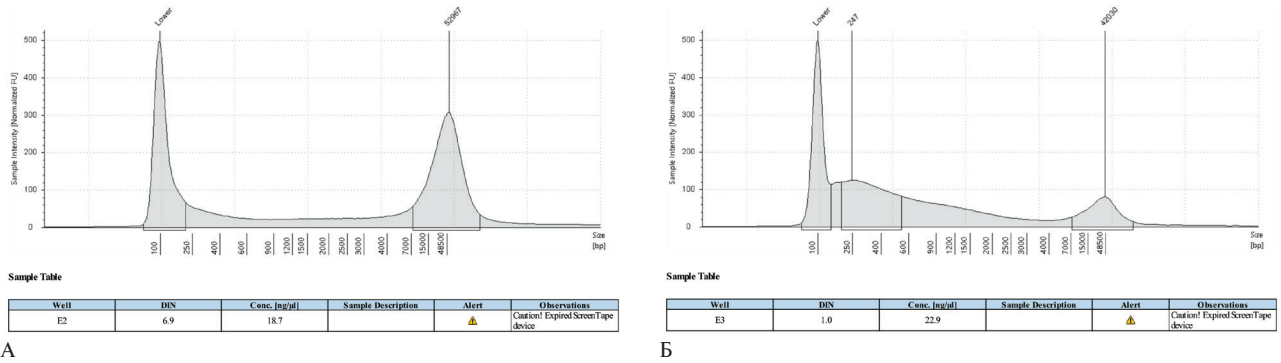


Рис. 4 Данные по степени деградации выделенной ДНК из образцов скелетных мышц с использованием набора Tissue M (Raissol Bio, Россия). А — мышца, 0 ч, Б — мышца, 24 ч.
Примечание: ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота.

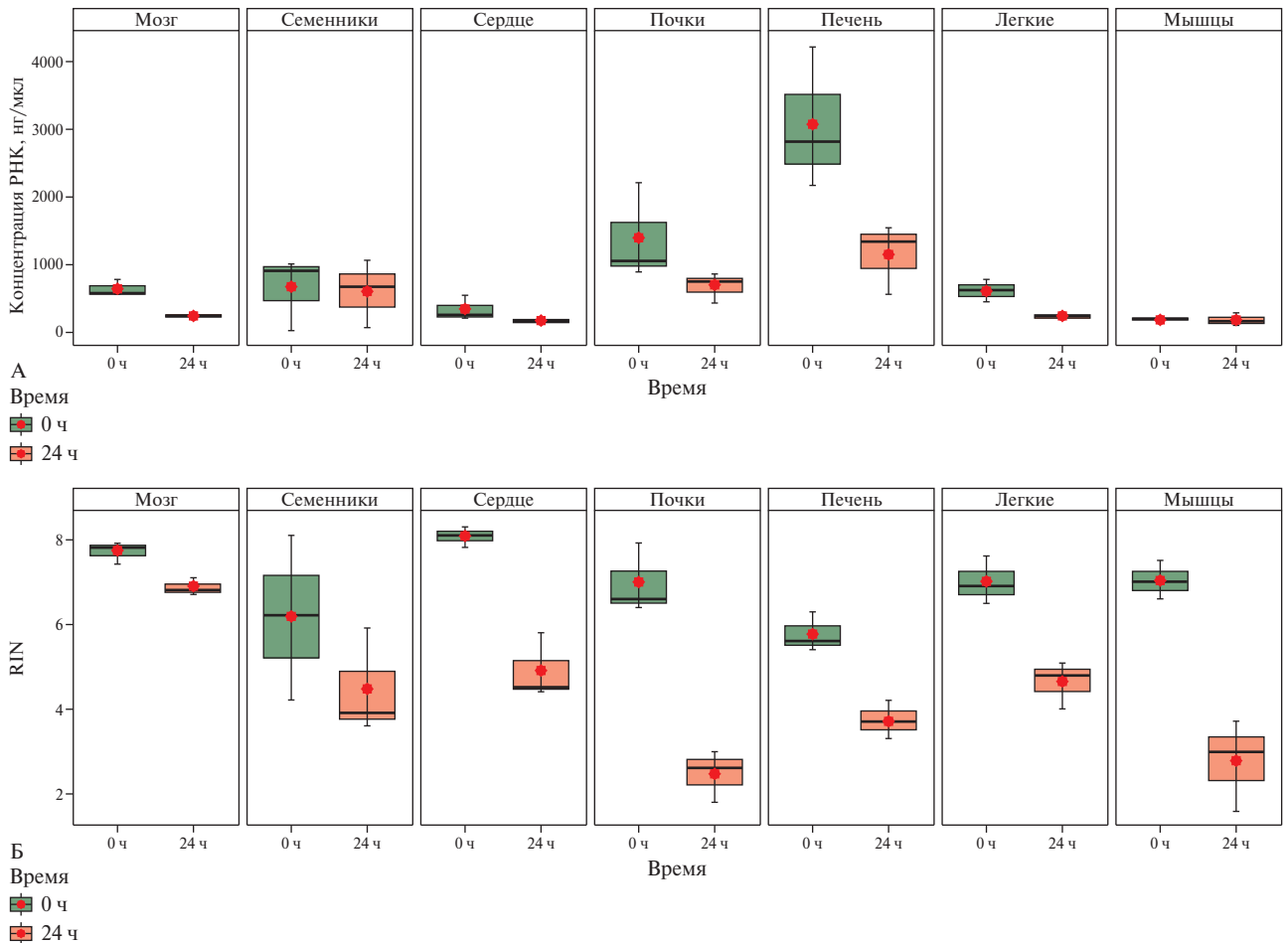


Рис. 5 А. Данные по концентрации выделенной РНК из различных тканей; Б. Данные по степени деградации выделенной РНК (показатель RIN).
Примечание: РНК — рибонуклеиновая кислота, RIN — RNA Integrity Number (степень деградации РНК).

симости от времени эвтаназии животного получены при использовании набора QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Германия) для образцов тканей мозга, печени и почек (рисунок 3 А).

Наиболее близкие к оптимальным показателям соотношения A260/280 и A260/230 получены при использовании набора QIAamp DNA Mini Kit (Qia-

gen, Германия), которые также сходятся для разных технических повторностей (рисунок 3 Б).

Значительные изменения в степени деградации ДНК получены при сравнении с контрольными образцами для тканей мозга, сердца, легких и скелетных мышц при использовании набора Tissue M (Raissol Bio, Россия) (рисунок 4).

Выделение РНК из образцов тканей

РНК выделяли из контрольных (0 ч после эвтаназии) и опытных образцов тканей (24 ч после эвтаназии). Для выделения образцов РНК из тканей также был использован только набор Qiagen RNEasy Mini kit (Qiagen, Германия), который позволил провести сравнительную оценку выхода РНК в зависимости от вида ткани животного и ПМИ.

Отметим, что наиболее высокие показатели концентрации РНК получены для таких тканей как печень и почки, наименьшие — для скелетных мышц. В зависимости от ПМИ, концентрация выделенной РНК закономерно снижалась во всех видах ткани, кроме половых органов (рисунок 5 А). В среднем, концентрация РНК в образцах при взятии органов через 24 ч после эвтаназии снизилась на 50%.

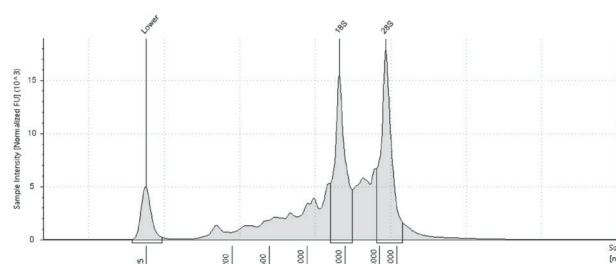
Аналогично снижается показатель степени деградации РНК (RIN — RNA integrity number,) в зависимости от ПМИ (рисунок 5 Б). Наименьшие различия между показателями RIN для контрольных и опытных образцов получены для тканей мозга и семенников, а наибольшей деградации подверглась РНК, выделенная из почек и скелетных мышц (таблица 3, рисунок 6). Показатель RIN является важным для оценки пригодности выделенной РНК для дальнейших исследований, особенно для анализов, когда важно наличие высокомолекулярной РНК (такие как секвенирование следующего поколения, NGS-секвенирование).

Обсуждение

Экстракция НК, полученных от модельных организмов, представляет собой критически значимый этап в проведении молекулярно-генетических исследований. В связи с этим важное значение приобретает оптимальный выбор реагентов и протоколов, обеспечивающих получение НК с высокими качественно-количественными показателями. В работе проведен сравнительный анализ эффективности коммерческих наборов для выделения геномной ДНК из образцов крови, также наборов для выделения ДНК или РНК из образцов различных типов ткани непосредственно после эвтаназии животного и спустя 24 ч автолизной деградации при комнатной температуре.

Полученные результаты свидетельствуют, что при выборе оптимального метода выделения следует учитывать несколько факторов: тип биоматериала, требуемое количество и чистоту НК, продолжительность работ.

Для выбора оптимального набора для выделения ДНК ключевым фактором является показатель концентрации [8]. Наилучшие значения при выделении ДНК из образцов крови животных были получены с использованием коммерческих наборов на основе спин-колонок, которые позволяли получить наибольший выход НК и оптимальные соот-



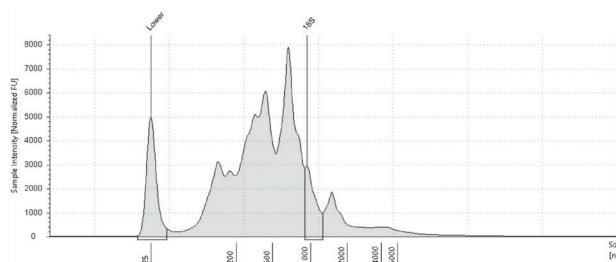
Sample Table

Well	RINc	28S/18S (Area)	Conc. (ng/ul)	Sample Description	Alert	Observations
D1	7.5	1.1	218	m0040040905	⚠	Caution! Expanded Screen Tape device

Peak Table

Size (nt)	Calibrated Conc. (ng/ul)	Assigned Conc. (ng/ul)	Peak Molarity (nmol/l)	% Integrated Area	Peak Comment	Observations
25	36.0	36.0	4240	-	-	Lower Marker
1823	56.6	-	81.7	46.52	-	18S
4662	58.2	-	36.7	53.48	-	28S

А



Sample Table

Well	RINc	28S/18S (Area)	Conc. (ng/ul)	Sample Description	Alert	Observations
C3	1.6	-	132	m0040300905	⚠	Caution! Expanded Screen Tape device. The upper ribosomal fragment has degraded

Peak Table

Size (nt)	Calibrated Conc. (ng/ul)	Assigned Conc. (ng/ul)	Peak Molarity (nmol/l)	% Integrated Area	Peak Comment	Observations
25	36.0	36.0	4240	-	-	Lower Marker
944	9.36	-	29.2	100.00	-	18S

Б

Рис. 6 Данные по степени деградации РНК для образцов тканей скелетных мышц контрольных (А) и опытных животных (Б). Примечание: РНК — рибонуклеиновая кислота.

Таблица 3
Концентрации и значения RIN для РНК, выделенной из тканей животных, М±SD

Ткань	ПМИ, ч	Концентрация РНК, нг/мкл	RIN
Легкое	0	617±164	7,0±0,6
Легкое	24	244±49	4,6±0,6
Мозг	0	648±119	7,7±0,3
Мозг	24	253±18	6,9±0,2
Печень	0	3066±1052	5,8±0,5
Печень	24	1152±525	3,7±0,5
Почка	0	1387±719	7,0±0,8
Почка	24	688±220	2,5±0,6
Семенники	0	656±546	6,2±2,0
Семенники	24	606±498	4,5±1,3
Сердце	0	340±180	8,1±0,3
Сердце	24	173±52	4,9±0,8
Мышцы	0	187±17	7,0±0,5
Мышцы	24	191±99	2,8±1,1

Примечание: М±SD — среднее ± стандартное отклонение; ПМИ — постмортальный интервал, РНК — рибонуклеиновая кислота, RIN — RNA Integrity Number (степень деградации РНК).

ношения показателей чистоты. Следует отметить, что такие наборы требуют дополнительных финансовых расходов при организации единой приборной линии для автоматизированного выделения, по сравнению с наборами на основе магнитных частиц [2].

Анализ влияния времени хранения образцов (0 ч и 24 ч после эвтаназии) выявил закономерное снижение во времени концентрации выделяемых НК. Наиболее выраженное уменьшение выхода наблюдалось для печени и скелетных мышц, что согласуется с предыдущими исследованиями влияния ПМИ на количественный выход ДНК [8].

Сравнение методов выделения по принципу действия показало, что сорбция на магнитные частицы (наборы GM Tissue и Tissue M, Raissol Bio, Россия) обеспечивает наибольший выход ДНК из тканей, но требует значительного времени. Колоночные методы (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen, Германия) демонстрируют более быстрое выделение НК, но с меньшей концентрацией. Продолжительность выделения для тканей оказалась значительно больше, чем для крови, достигая 22 ч для набора GM Tissue (Raissol Bio, Россия) из-за необходимости длительного лизиса, что, вероятно, положительно сказалось на выходе ДНК.

Набор GM Tissue (Raissol Bio, Россия) демонстрирует стабильно высокую эффективность при выделении ДНК из различных органов. В свежих образцах (0 ч) его преимущество обусловлено мощными ингибиторами нуклеаз, предотвращающими деградацию ДНК. Выделенная ДНК из тканей органов через 24 ч после эвтаназии, несмотря на начавшийся автолиз, имеет более высокие показатели контроля качества по сравнению с органами 0 ч после эвтаназии благодаря оптимизированному составу набора, эффективно работающему с частично разрушенными тканями. Особый случай представляют скелетные мышцы, где все наборы, включая GM Tissue (Raissol Bio, Россия), показывают классическую динамику — максимальный выход ДНК в свежих образцах [9]. Это объясняется устойчивой структурой мышечной ткани и низкой активностью нуклеаз. Этот результат подтверждает, что превосходство GM Tissue (Raissol Bio, Россия) для выделения ДНК и других органов отражает его реальные преимущества, а не методические погрешности.

Результаты исследования демонстрируют существенное влияние как типа ткани, так и продолжительности ПМИ на количественные и качественные показатели выделенной РНК. При сравнительном анализе характеристик выделения РНК из различных типов тканей, выявили, что наибольшая концентрация РНК характерна для образцов печени, а наименьшая для образцов мышц и сердца; полученные данные ожидаемы и соотносятся

с результатами работ Walker DG, et al. (2016) [10] и Yamamoto T, et al. (2012) [11]. Высокая концентрация РНК из тканей печени и почек связана с тем, что это наиболее метаболически активные ткани, которые характеризуются высоким уровнем транскрипции. В свою очередь, низкая концентрация в образцах мышечных тканей может быть связана с более низкой плотностью ядер [10].

Во всех исследованных тканях наблюдалось снижение концентрации и значения RIN при увеличении ПМИ до 24 ч, исключением являются образцы семенников, где падение концентрации и значения RIN было незначительным. В среднем, потеря концентрации составила ~50%, что указывает на сохранение активности нуклеаз после прекращения жизнедеятельности организма. Наиболее выраженная деградация наблюдалась в тканях почек и скелетных мышц, где значения RIN упали до критически низких значений — 2,5 и 2,8, соответственно, что делает полученные образцы РНК малоприспособными для большинства молекулярно-генетических исследований [12]. Особый интерес представляет стабильность РНК в тканях мозга и семенниках, что, скорее всего, связано с наличием ингибиторов рибонуклеаз, уникальным составом тканей или специфической упаковкой матричной РНК в рибонуклеопротеиновые комплексы [13, 14].

Полученные данные имеют важное значение для выбора оптимального набора в зависимости от типа биоматериала, определения допустимых сроков хранения и транспортировки биоматериала, а также интерпретации результатов при работе с архивными образцами и разработке протоколов для особо чувствительных к изменению условий хранения тканей. Перспективным направлением представляется дальнейшая оптимизация российских наборов для сокращения времени выделения без потери эффективности, что позволит создать конкурентоспособные продукты, превосходящие зарубежные аналоги по всем ключевым параметрам, а также разработка специализированных консервирующих растворов для различных типов тканей, позволяющих минимизировать процесс деградации НК при хранении.

Заключение

Таким образом, настоящее исследование позволило провести сравнительный анализ различных коммерческих наборов для выделения ДНК из крови и тканей животных, включая оценку динамики деградации НК (DIN) в зависимости от времени хранения биоматериала. Результаты демонстрируют значительную вариабельность эффективности методов в зависимости от типа биоматериала, принципа выделения и производителя реагентов. Оценка влияния ПМИ на выход и степень

деградации РНК позволит исследователям выбрать наиболее подходящий коммерческий набор для проведения первичного этапа молекулярно-генетического исследования.

Полученные данные имеют важное практическое значение для планирования сроков транспор-

тировки образцов в лабораторию, выбора оптимального метода забора биоматериала и выделения НК.

Отношения и деятельность: все авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Литература/References

1. Filippova AV, Ryabuhina MV, Odnokov GN, et al. Comparative analysis of the efficiency of DNA extraction methods from animal tissues. *Bulletin of Nizhnevartovsk State University*. 2024;2:76-85. (In Russ.) Филиппова А. В., Рябухина М. В., Одиноков Г. Н. и др. Сравнительный анализ эффективности методов экстракции ДНК из тканей животных. *Вестник Нижневартковского государственного университета*. 2024;2:76-85. doi:10.36906/2311-4444/24-2/07.
2. Antonova OS, Korneva NA, Belov YuV, et al. Methods of nucleic acid purification and separation in molecular biology. *Nauchnoe priborostroenie*. 2010;20:1:3-9. (In Russ.) Антонова О. С., Корнева Н. А., Белов Ю. В. и др. Эффективные методы выделения нуклеиновых кислот для проведения анализов в молекулярной биологии. *Научное приборостроение*. 2010;20:1:3-9.
3. Esa MS, Faujan NH, Rajab HA, et al. Comparison of DNA Concentration and Purity of Animal Blood Extracted Using Different DNA Extraction Kits. *MJoSHT*. 2018;2(Special Issue). doi:10.33102/mjosht.v2i.42.
4. Żarczyńska M, Żarczyński P, Tomsia M. Nucleic Acids Persistence—Benefits and Limitations in Forensic Genetics. *Genes*. 2023;14(8):1643. doi:10.3390/genes14081643.
5. Bauer M. RNA in forensic science. *Forensic Sci Int Genet*. 2007; 1(1):69-74. doi:10.1016/j.fsigen.2006.11.002.
6. Chatterjee N, Walker GC. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environ Mol Mutagen*. 2017;58(5):235-63. doi:10.1002/em.22087.
7. Lucena-Aguilar G, Sánchez-López AM, Barberán-Aceituno C, et al. DNA Source Selection for Downstream Applications Based on DNA Quality Indicators Analysis. *Biopreserv Biobank*. 2016;14(4):264-70. doi:10.1089/bio.2015.0064.
8. Dilley K, Pagan F, Chapman B. Methods for ensuring the highest DNA concentration and yield in future and retrospective trace DNA extracts. *Sci Justice*. 2021;61(2):193-7. doi:10.1016/j.scijus.2020.11.005.
9. Al-Griw HH, Zraba ZA, Al-Muntaser SK, et al. Effects of storage temperature on the quantity and integrity of genomic DNA extracted from mice tissues: A comparison of recovery methods. *Open Vet J*. 2017;7(3):239-43. doi:10.4314/ovj.v7i3.7.
10. Walker DG, Whetzel AM, Serrano G, et al. Characterization of RNA isolated from eighteen different human tissues: results from a rapid human autopsy program. *Cell Tissue Bank*. 2016; 17(3):361-75. doi:10.1007/s10561-016-9555-8.
11. Yamamoto T, Nakashima K, Maruta Y, et al. Improved RNA extraction method using the BioMasher and BioMasher power-plus. *J Vet Med Sci*. 2012;74(12):1561-7. doi:10.1292/jvms.12-0213.
12. Li S, Liu J, Zhao M, et al. RNA quality score evaluation: A preliminary study of RNA integrity number (RIN) and RNA integrity and quality number (RNA IQ). *Forensic Sci Int*. 2024;357:111976. doi:10.1016/j.forsciint.2024.111976.
13. Bonadio RS, Nunes LB, Moretti PNS, et al. Insights into how environment shapes post-mortem RNA transcription in mouse brain. *Sci Rep*. 2021;11(1):13008. doi:10.1038/s41598-021-92268-y.
14. Latorre N, Dorda BA, Rey I, et al. RNA quality and protamine gene expression after storage of mouse testes under different conditions. *PLoS One*. 2024;19(11):e0314013. doi:10.1371/journal.pone.0314013.