

## Сбор и хранение ДНК-содержащего биоматериала и выделенной ДНК

Долудин Ю. В., Лимонова А. С., Козлова В. А., Ефимова И. А., Борисова А. Л., Мешков А. Н., Покровская М. С., Драпкина О. М.

ФГБУ “Национальный медицинский исследовательский центр терапии и профилактической медицины” Минздрава России. Москва, Россия

Развитие биомедицины сопровождается появлением новых технологий, методов диагностики и лечения, а также возможностей применения в медицинской практике новых типов биологических мишеней, в частности, нуклеиновых кислот. В качестве объектов генетических исследований используют геномную дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК), внеклеточную ДНК (вкДНК) и ДНК микробиоты, получаемые из разных типов образцов: тканей, крови и ее производных, кала и др. Использование новых технологий для ДНК-анализа потребовало разработки стандартизованных методов процессинга биообразцов с целью получения качественных образцов ДНК. В научно-медицинских исследованиях применяются различные методы сбора, пробоподготовки и хранения разных видов ДНК-содержащего биоматериала, выделенной ДНК и методы оценки качества биообразцов, а также стандарты биобанкирования. Очевидно, что использование единых стандартов позволит проводить крупномасштабные генетические исследования на базе биобанков и отдельных научных лабораторий. Активное участие во внедрении единых стандартов биобанкирования принимают специалисты профессиональных организаций, таких как ISBER (International Society for Biological and Environmental Repositories),

BBMRI-ERIC (Biobanking and BioMolecular Resources Research Infrastructure-European Research Infrastructure Consortium), ESBB (European, Middle Eastern & African Society for Biopreservation and Biobanking) и российская Национальная ассоциация биобанков и специалистов по биобанкированию (НАСБИО).

**Ключевые слова:** биобанк, биобанкирование, стандартные методы, выделение ДНК, нуклеиновые кислоты, ДНК, внеклеточная ДНК, микробиота, биообразцы.

**Отношения и деятельность:** нет.

Поступила 05/11-2020

Получена рецензия 22/11-2020

Принята к публикации 07/12-2020



**Для цитирования:** 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;19(6):2730. doi:10.15829/1728-8800-2020-2730

### Collection and storage of DNA-containing biomaterial and isolated DNA

Doludin Yu. V., Limonova A. S., Kozlova V. A., Efimova I. A., Borisova A. L., Meshkov A. N., Pokrovskaya M. S., Drapkina O. M. National Medical Research Center for Therapy and Preventive Medicine. Moscow, Russia

The advances of biomedicine include the new technologies, diagnosis and treatment techniques, as well as the practical use of new types of biological targets, in particular, nucleic acids. Genomic deoxyribonucleic acid (DNA), extracellular DNA (exDNA) and microbiome DNA obtained from different types of samples (tissues, blood and its derivatives, feces, etc.) are used as objects of genetic research. The use of new technologies for DNA analysis required the development of standardized methods for processing biological samples in order to obtain high-quality DNA samples. The research uses various methods for collecting, preparing samples and storing various DNA-containing biomaterials and isolated DNA, as well as methods for assessing the quality of samples and biobank standards. It is obvious that the use of uniform standards will allow large-scale genetic research on the basis of biobanks and research laboratories. Specialists from professional organizations such as International Society for Biological and Environmental Repositories (ISBER), Biobanking and BioMolecular Resources Research Infrastructure-European Research Infrastructure

Consortium (BBMRI-ERIC), European, Middle Eastern & African Society for Biopreservation and Biobanking (ESBB) and the Russian National Association of Biobanks and Biobanking Professionals.

**Key words:** biobank, biobanking, standard methods, DNA extraction, nucleic acids, DNA, extracellular DNA, microbiota, biological samples.

**Relationships and Activities:** none.

Doludin Yu. V.\* ORCID: 0000-0002-0554-9911, Limonova A. S. ORCID: 0000-0003-1500-3696, Kozlova V. A. ORCID: 0000-0002-3843-6980, Efimova I. A. ORCID: 0000-0002-3081-8415, Borisova A. L. ORCID: 0000-0003-4020-6647, Meshkov A. N. ORCID: 0000-0001-5989-6233, Pokrovskaya M. S. ORCID: 0000-0001-6985-7131, Drapkina O. M. ORCID: 0000-0002-4453-8430.

\*Corresponding author: doludin@gmail.com

\*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

e-mail: doludin@gmail.com

Тел.: +7 (915) 472-28-08

[Долудин Ю. В.\* — н.с. лаборатории “Банк биологического материала”, ORCID: 0000-0002-0554-9911, Лимонова А. С. — лаборант лаборатории клиники, ORCID: 0000-0003-1500-3696, Козлова В. А. — лаборант-исследователь лаборатории “Банк биологического материала”, ORCID: 0000-0002-3843-6980, Ефимова И. А. — лаборант-исследователь лаборатории “Банк биологического материала”, ORCID: 0000-0002-3081-8415, Борисова А. Л. — ведущий инженер лаборатории “Банк биологического материала”, ORCID: 0000-0003-4020-6647, Мешков А. Н. — к.м.н., руководитель лаборатории молекулярной генетики, ORCID: 0000-0001-5989-6233, Покровская М. С. — к.б.н., руководитель лаборатории “Банк биологического материала”, ORCID: 0000-0001-6985-7131, Драпкина О. М. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, директор, ORCID: 0000-0002-4453-8430].

Received: 05/11-2020

Revision Received: 22/11-2020

Accepted: 07/12-2020

For citation: Doludin Yu. V., Limonova A. S., Kozlova V. A., Efimova I. A., Borisova A. L., Meshkov A. N., Pokrovskaya M. S., Drapkina O. M. Col-

lection and storage of DNA-containing biomaterial and isolated DNA. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2020;19(6):2730. (In Russ.) doi:10.15829/1728-8800-2020-2730

вкДНК — внеклеточная ДНК, ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота, НАСБИО — Национальная ассоциация биобанков и специалистов по биобанкированию, НК — нуклеиновая кислота, ПЦР — полимеразная цепная реакция, РНК — рибонуклеиновая кислота, ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота, BBMRI-ERIC — Biobanking and BioMolecular Resources Research Infrastructure — European Research Infrastructure Consortium, ISBER — International Society for Biological and Environmental Repositories, ISO — International Organization for Standardization (международная организация по стандартизации), NGS — Next Generation Sequencing (секвенирование следующего поколения).

## Введение

Развитие биомедицины сопровождается появлением новых технологий, методов диагностики и лечения, а также возможностей применения в медицинской практике новых типов биологических мишеней, в частности, нуклеиновых кислот (НК). Персонализированная медицина — современное направление, которое во многом опирается на генетические исследования, позволяющие на индивидуальном уровне прогнозировать возникновение и течение заболеваний. В последнее время в рамках геномики существенно расширился поиск ранних маркеров заболеваний и разработка диагностических тест-систем. В качестве объектов генетических исследований используют геномную внутриклеточную дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК), внеклеточную ДНК (вкДНК) и ДНК микробиоты, которые получают из разных типов образцов: тканей, крови и ее производных, кала и др. Основными объектами изучения разных видов ДНК являются однонуклеотидные вариации, структурные вариации и тандемные повторы, которые, как было продемонстрировано, можно использовать в качестве биомаркеров развития заболеваний [1]. Много работ посвящено эпигенетическим изменениям. Например, показано, что изменения в паттерне метилирования определенных генов ассоциированы с развитием заболеваний человека, в частности, с онкогенезом [2]. вкДНК, которая попадает в кровоток в результате апоптоза, некроза, активной секреции опухоли и при метастазировании, имеет большое значение как для изучения молекулярной патологии, так и в клинической онкологии [3]. Данные анализов циркулирующих НК могут использоваться для мониторинга реакции на лечение, оценки возникновения лекарственной устойчивости и контроля минимальной остаточной болезни. В последнее время много внимания уделяется изучению ДНК микробиоты кишечника [4]. Кишечная микробиота играет важную роль в поддержании метаболического гомеостаза и нормальном функционировании иммунитета [5]. Изменения ее состава происходят при различных патологических состояниях, таких как ожирение, воспалительные заболевания кишечника, сахарный

диабет 2 типа, сердечно-сосудистые заболевания, заболеваниях центральной нервной системы, онкологические заболевания [6-9].

Необходимость изучения НК как биомаркеров привела к развитию новых методов анализа. В настоящее время широко используются две технологии геномной медицины, позволяющие быстро и эффективно работать с целым геномом — ДНК-микрочипы и технологии массового параллельного секвенирования NGS (Next Generation Sequencing, секвенирование следующего поколения) [1, 10]. Кроме того, широко используются методы секвенирования по Сенгеру, панельные тест-системы, метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) и ПЦР в режиме реального времени. Использование новых технологий потребовало, в свою очередь, разработки стандартизованных методов получения и процессинга различного биоматериала с целью получения образцов ДНК требуемого качества. Дальнейшее внедрение современных технологий, основанных на исследованиях ДНК, в медицинскую практику, в частности, в геномную и прецизионную медицину, невозможно без использования стандартизованных методов пробоподготовки и хранения ДНК. Специалистами профессиональных организаций, таких как ISBER (International Society for Biological and Environmental Repositories), BBMRI-ERIC (Biobanking and BioMolecular Resources Research Infrastructure-European Research Infrastructure Consortium), ESBB (European, Middle Eastern & African Society for Biopreservation and Biobanking), ISO (International Organization for Standardization), CEN (Comité Européen de Normalisation), разработаны и успешно применяются на практике стандарты биобанкирования для сбора, пробоподготовки и хранения различных видов ДНК-содержащего биоматериала, что позволяет проводить крупномасштабные генетические исследования на базе биобанков [11, 12]. Это стандарты, разработанные ISO и CEN, в частности, ISO 20186-2:2019 (геномная ДНК) и ISO 20186-3:2019 (вкДНК). Национальная ассоциация биобанков и специалистов по биобанкированию (НАСБИО) ведет работу по адаптации и внедрению этих стандартов в России [13]. Данный обзор литературы

описывает современные методы сбора, процессинга и хранения ДНК-содержащего биоматериала и ДНК и предназначен для широкого круга лиц, связанных с биобанкированием и проведением генетических исследований: врачей, научных сотрудников и организаторов здравоохранения.

#### **Сбор и хранение биоматериала для выделения ДНК**

Сбор образцов для научных исследований — сложный процесс, включающий несколько этапов [14]. Все они регламентированы в настоящее время правилами биобанкирования. Важным аспектом является подписание добровольного информированного согласия человека на взятие у него биоматериала, на его хранение неограниченное время и использование только в научных исследованиях, в т.ч. генетических, в т.ч. третьей стороной. Большую роль на этом этапе играет доверие донора к организации, которая проводит исследование. Мотивацию участвовать в исследовании можно повысить, рассказав участникам, какую пользу оно может принести [15]. Локальные этические комитеты утверждают формы информированного согласия и информационного листа для участников (пациентов), в которых подчеркивается сохранение анонимности получаемых данных и ограниченность доступа к ним [12].

Процесс сбора биообразцов для генетических исследований (например, кровь, биоптаты) может происходить в медицинских учреждениях или на дому (например, сбор образцов мочи или кала). Далее образцы поступают в биобанк (лабораторию) и либо сразу помещаются на хранение в соответствующие условия, либо подвергаются процессингу и выделению ДНК. Выделенная ДНК используется для исследований и/или хранится для будущих исследований.

#### **Источники геномной ДНК**

Для изучения НК кислот используются преимущественно образцы тканей и цельная кровь. В качестве образцов тканей чаще всего используют биоптаты, парафиновые блоки фиксированных формалином тканей — FFPE (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded) и образцы свежезамороженной ткани. В качестве образцов крови используют цельную кровь с этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА), сухие пятна крови (Dried Blood Spots, DBS), лейкоцитарную пленку, мононуклеарные клетки крови (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMC). Также используются образцы, взятые из спинномозговой жидкости (Cerebrospinal Fluid, CSF), мочи и фекалий [14].

Образцы крови, собранные в пробирки с ЭДТА, являются наиболее экономичным и удобным типом образцов для исследований геномной ДНК [16]. В зависимости от типа образца, планируемого срока хранения и дальнейших целей исследований био-

образцы могут храниться при различных условиях ( $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $-80^{\circ}\text{C}$ ,  $-196^{\circ}\text{C}$ ) [14]. Длительное хранение (для будущих поколений исследователей) крови и ее компонентов (сыворотка, плазма и мононуклеарные клетки крови) рекомендуется осуществлять при температуре  $-196^{\circ}\text{C}$ . Однако в работе биобанка Исландии было показано, что цельную кровь с ЭДТА, собираемую для геномных исследований, можно хранить при температуре  $-30^{\circ}\text{C}$  в течение 19 лет без потери качества выделяемой ДНК. Геномная ДНК была выделена из 2758 образцов цельной крови, собранной в вакутейнеры с ЭДТА объемом 4 мл в период с 1997 по 2012гг, качество ДНК определяли спектрофотометрическим методом [17]. В другой работе показали, что длительное хранение образцов крови не влияет на профиль метилирования и качество ДНК, снижается лишь количественный выход ДНК при выделении. Образцы цельной крови с ЭДТА были собраны у 8 здоровых добровольцев и хранились в течение разных промежутков времени (до 1 года) при разных температурах [18]. Как альтернатива низкотемпературному хранению образцов крови для изучения ДНК могут использоваться сухие пятна крови, хранение которых возможно при комнатной температуре с помощью пробоотборных бумажных карт. После хранения сухих пятен крови в течение 10 лет, из них могут быть выделены ДНК и белки без потери качества биомолекул [14, 19]. Для исследований ДНК может быть использована и лейкоцитарная пленка (buffy coat). В работе 2019г образцы крови, полученные от 30 здоровых добровольцев, были использованы для получения ДНК из лейкоцитарной пленки и цельной крови. По данным этого исследования, после хранения в течение 1 года при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$  количественный выход ДНК из лейкоцитарной пленки оказался ниже, чем из цельной крови, но разницы в качестве ДНК обнаружено не было [20].

FFPE — наиболее распространенный метод хранения образцов ткани. Хранение тканей FFPE возможно при комнатной температуре в течение нескольких десятилетий. Однако фиксация формалином может вызывать как межбелковое, так и внутрибелковое связывание, а также сшивание гистонов с молекулой ДНК. На качество НК, получаемых из образцов FFPE, также влияют буферный формалин, время и температура фиксации. Дополнительно на качество НК влияют периоды посмертного интервала, после которого был взят образец, и холодовой ишемии. Рекомендуемое время посмертного интервала для сбора образцов тканей составляет от 4 ч после смерти до 12 ч после начала холодовой ишемии. Для последующих исследований ДНК фиксацию ткани формалином рекомендуется осуществлять в течение 72 ч после взятия образца [14].

В исследованиях НК часто применяются и об-

разцы свежей ткани. Для достижения наилучших результатов ДНК-исследований свежую ткань рекомендуется хранить при  $-196^{\circ}\text{C}$  [14].

Проведение геномных исследований, как правило, требует выборки большого размера и разного типа биоматериала. Например, биобанк Великобритании содержит выборку примерно из 500 тыс. участников в возрасте 40-69 лет, для которых были собраны образцы крови, мочи и слюны. Генетические данные британского Биобанка содержат генотипы 488 377 участников [21].

#### Источники вкДНК

вкДНК может присутствовать в биологических жидкостях, таких как кровь, моча, слюна, синовиальная и цереброспинальная жидкости. Выделяют вкДНК в большинстве случаев из производных крови — сыворотки и плазмы [22]. Сыворотка — биоматериал, наиболее часто используемый в клинических лабораториях. В ряде научных исследований сообщается о значительно более высокой концентрации вкДНК в сыворотке, чем в плазме. Однако повышенная концентрация вкДНК в сыворотке может быть вызвана частичным лизисом белых кровяных телец в процессе свертывания крови. Таким образом, концентрация специфической вкДНК сильно искажается наличием в сыворотке геномной ДНК. Исходя из этого для выделения вкДНК рекомендуется использование только плазмы крови.

Оптимальным и экономически целесообразным является использование пробирок с ЭДТА для взятия крови и получения плазмы с последующим выделением вкДНК. ЭДТА не препятствует прохождению ПЦР, предохраняет вкДНК от контаминации геномной ДНК вплоть до 6 ч [23], что объясняется инактивирующим действием ЭДТА на дезоксирибонуклеазу (ДНКазу). Есть данные, что оптимальным сроком хранения в пробирке с ЭДТА от момента забора крови до последующего выделения является двухчасовой интервал, для более длительного хранения необходимо соблюдение условия пониженной температуры (до  $+2-8^{\circ}\text{C}$ ). Для предохранения ядерных клеток крови от разрушения были разработаны специальные пробирки CellSave и Streck's Cell-Free DNA. Они предназначены для защиты вкДНК от контаминации геномной ДНК до 14 сут. при комнатной температуре, в связи с чем их можно использовать при транспортировке образцов крови. Однако использование данных пробирок неэффективно при немедленной обработке крови (центрифугировании), т.к. в этом случае нет необходимости в стабилизаторах [23-25]. Важно отметить, что механическое воздействие во время транспортировки образцов способствует лизису клеток и высвобождению геномной ДНК.

После центрифугирования плазма (или сыворотка) могут храниться длительное время при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$ . Хранение при  $-20^{\circ}\text{C}$  нежелатель-

но, поскольку при такой температуре увеличивается фрагментация вкДНК [22]. Содержание вкДНК в плазме при хранении при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$  не меняется в течение 2 нед., а при хранении в течение года отмечается деградация вкДНК на 30% от исходного содержания. Рекомендуемый срок хранения плазмы крови при температуре  $+4^{\circ}\text{C}$  — трое суток, при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  — 3 мес., при  $-80^{\circ}\text{C}$  — 9 мес. [26].

#### Источники ДНК микробиоты кишечника

Качество и количество выделяемой ДНК микробиоты существенно зависит от способа сбора биоматериала. В первых исследованиях по крупномасштабному секвенированию ДНК кишечной микробиоты применялось максимально быстрое замораживание образцов фекалий до температуры  $-80^{\circ}\text{C}$  [27]. С помощью 16S секвенирования показано, что состав микробиоты при хранении при такой температуре не меняется в течение 4 нед. или даже 6 мес., по сравнению с образцами, исследованными в течение 30 мин после получения биоматериала. Однако существуют данные, что при замораживании биообразцов может меняться состав микробиоты [28]. Используя культуральный метод и секвенирование с использованием MiSeq было продемонстрировано, что на уровне отдела и семейства различий при выделении бактерий из замороженных и только что полученных фекалий не было. Однако при этом менялось соотношение между родами *Leuconostoc* и *Faecalibacterium*.

С целью упрощения процедуры сбора биоматериала и решения проблем транспортировки и хранения были разработаны новые протоколы с применением различных температур, продолжительности пробоподготовки, с использованием стабилизатора и без него. Когда быстрый анализ или замораживание биообразцов невозможны, хранение в холодильнике при температуре  $+4^{\circ}\text{C}$  позволяет замедлить процессы роста бактерий. Образцы, которые были исследованы в течение 24 ч после их получения при хранении на  $+4^{\circ}\text{C}$ , пригодны для проведения метагеномных исследований [29, 30]. Однако для транскриптомных исследований наряду с охлаждением рекомендуется использовать стабилизаторы [31]. Поскольку охлаждение замедляет в т.ч. и ферментативные реакции, оно позволяет проводить анализ метаболома, но время хранения при этом не должно превышать 2 ч из-за снижения содержания летучих компонентов [31]. Также предпринимались попытки по хранению биообразцов при комнатной температуре до 24 ч, при этом состав микробиоты, по результатам анализа 16S рРНК, не менялся. На стабильность генома микроорганизмов оказывает влияние активность ДНКазы, что стало поводом для изучения использования различных стабилизаторов: этанол, ЭДТА буферы, а также коммерческие продукты RNAlater,

OMNIgene-GUT и FTA cards [29, 32]. Однако у них есть определенные недостатки. Показано, что использование этанола может существенно снизить выход ДНК в сравнении со свежеморожеными образцами [32], применение Трис-ЭДТА буфера и RNAlater может влиять на содержание популяций некоторых родов микробиоты [29]. Использование реагента OMNIgene-GUT позволяло сохранять биообразец до 8 нед. при комнатной температуре [33, 34], однако при этом происходило незначительное изменение популяций бактерий родов *Sutterella* и *Faecalibacterium genera* [29]. Тем не менее этот реагент обладает определенными преимуществами, поскольку он не токсичен и позволяет хранить биообразец при комнатной температуре [34–36].

Для изучения человеческого микробиома и его развития в зависимости от возраста, окружающей среды, диеты, образа жизни, заболеваний и лекарственной терапии формируются крупные выборки биообразцов микробиоты. В Гарвардской школе Чана (Harvard Chan School) планируется создание самой полной в мире коллекции образцов микробиома человека с привлечением >25 тыс. участников. Кроме того, среди микробиомных биобанков в последнее время развиваются “банки стула” (“stool banks”), использование которых может оказаться перспективным в лечении пациентов с заболеваниями кишечника [37].

#### Методы выделения ДНК

Качество ДНК зависит как от качества биологического образца, из которого она была выделена, так и от метода выделения. К настоящему времени разработано большое количество методик выделения ДНК.

**Выделение геномной ДНК.** К первой большой группе методик выделения ДНК относятся химические методы, основанные на биохимических свойствах клеточных компонентов для достижения желаемого молекулярного разделения. Метод твердофазного выделения НК (Solid-Phase Nucleic Acid Extraction, SPE) является одним из наиболее эффективных методов, поэтому он широко представлен на рынке в виде коммерческих наборов для выделения ДНК из разных биологических образцов, таких как цельная кровь с ЭДТА, мононуклеарные клетки крови, сыворотка, сухие пятна крови, а также свежие или замороженные образцы тканей [14, 38]. Основной принцип определения с использованием этих наборов основан на лизисе клеток с последующей адсорбцией высвобожденной ДНК с помощью хаотропных агентов, которые дестабилизируют водородные связи, ван-дер-ваальсовы и гидрофобные взаимодействия, и очистке выделенной ДНК при помощи магнитных частиц, центрифугирования или фильтрации. После очистки ДНК от белков и клеточных частиц проводят экстракцию ДНК при помощи элюирующего буфера,

чаще всего Трис-ЭДТА при pH 8,3. Большинство твердофазных методов используют спин-колонку для связывания НК под действием центробежной силы. В качестве связывающего элемента в спин-колонках используются кремнеземные матрицы, стеклянные частицы или порошок, диатомовая земля или анионообменные носители, которые обычно используются совместно с буферными растворами с определенным pH и концентрацией соли. В зависимости от количества образцов, из которых одновременно проводят выделение ДНК, оно может быть автоматизированным или ручным.

Выбор коммерческого набора для выделения ДНК зависит от вида биообразца, из которого проводится выделение, и целей, для которых ДНК выделяют [14]. В настоящий момент мнения относительно выбора наилучшего набора для выделения НК из различных типов образцов расходятся [38]. Особый интерес могут представлять наборы, совместимые с автоматизированными решениями процесса выделения и банкирования НК, необходимость в которых постоянно растет [38].

Большинство образцов НК анализируют с помощью ПЦР, ДНК-микрочипов или NGS. Для этих методов на один тест обычно требуется от 10 нг до 1 мкг общего количества НК.

**Выделение вкДНК.** Первым этапом выделения вкДНК является центрифугирование биообразца, что позволяет отделить клетки, служащие источником загрязнения геномной ДНК. Условия центрифугирования (скорость, температура, продолжительность) зависят от типа биологической жидкости, из которой вкДНК выделяется. После центрифугирования плазма отделяется с помощью пипетки, на этом этапе важно не задеть промежуточный слой, содержащий тромбоциты и лейкоциты.

Для полной очистки плазмы от клеток центрифугирование необходимо проводить в два этапа: первое центрифугирование со скоростью от 800 до 1200 g при температуре +4° C в течение 10 мин и второе со скоростью от 14000 до 16000 g в течение 10 мин [24]. Второе центрифугирование необходимо для более полного удаления клеточного компонента крови, что позволяет уменьшить количество фрагментов ДНК длиной >300 пар нуклеотидов [39]. Концентрации вкДНК после двойного центрифугирования сходны с концентрациями, определяемыми после однократного центрифугирования с последующим фильтрованием через фильтр с порами диаметром 0,2 мкм (фильтрование через такой фильтр обеспечивает получение бесклеточной плазмы) [24].

В настоящее время существуют различные наборы для выделения вкДНК из плазмы; их можно разделить на две группы: это наборы на основе колонок и наборы с использованием магнитных частиц. Преимуществом использования магнитных

частиц является отсутствие стадии центрифугирования и возможность автоматизации процесса. Данные методы оптимизированы для выделения вкДНК. Сравнение эффективности различных наборов имеет определенные сложности, поскольку на результат выделения могут оказать влияние качество биообразцов и этап пробоподготовки.

Для выделения вкДНК из мочи используются как специальные наборы, например, Urine DNA Isolation Kit (Norgen Biotek Corp., Канада) и Extractall Urine DNA (Zymo Research Corp., США), так и в целом предназначенные для выделения вкДНК наборы.

Выделение вкДНК из плевральной жидкости представляет интерес при онкологическом поражении легких. Чаще всего для исследования используют образец плевральной жидкости объемом 2-5 мл, центрифугируют со скоростью 250 g в течение 10 мин при комнатной температуре и выделяют ДНК с помощью различных наборов, например QIAamp DNA Blood Midi Kit (QIAGEN, Нидерланды).

**Выделение ДНК микробиоты кишечника.** Для получения ДНК высокого качества для метагеномного анализа микробиоты этап выделения ДНК имеет решающее значение. Поскольку в составе клеточной стенки между видами бактерий существуют различия, результаты различных методов выделения ДНК могут не совпадать [40]. Для повышения эффективности выделения ДНК можно использовать деструкцию клеточной стенки Грам(+) бактерий методом с циркониевыми шариками (bead beating method) [40, 41].

В настоящий момент разработано большое количество протоколов по выделению ДНК микробиоты, а также проведено их сравнение [40, 41]. Крупные когортные исследования (Human Microbiome Project и International Human Microbiome Standards) предлагают стандартизированный протокол выделения ДНК с использованием набора QIAG QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, Нидерланды). Были проведены исследования по сравнению QIAG с другими протоколами выделения [40-44]. Так, при сравнении QIAG с классическими протоколами выделения (экстракция фенол/хлороформом и хаотропные методы), использование последних сопровождалось более высоким выходом ДНК, в то время как при использовании набора QIAG лучше оказались параметры качества выделенной ДНК [43]. При этом различий по результатам секвенирования 16S РНК в зависимости от используемого способа выделения обнаружено не было. Сотрудниками Института трансляционных медицинских наук и технологий (The Translational Health Science and Technology Institute, Индия) метод классического выделения ДНК был улучшен путем применения сочетания физических, химических и механических этапов подготовки образца для повышения количества ДНК, выделяемой из различных биообразцов без повреждения молекул ДНК [40]. Проводилось сравнение

данного метода с коммерческим набором для выделения Qiagen, оба метода позволили получить сопоставимые результаты. Тем не менее назвать какой-то из них абсолютно идеальным пока не представляется возможным.

Поскольку количество проводимых исследований по изучению микробиоты неуклонно возрастает, становится актуальным применение автоматизированных способов выделения ДНК из кала. В ряде исследований проводилось сравнение результатов таких автоматизированных способов выделения ДНК с использованием наборов QIAcube (QIAGEN, Нидерланды), MagNAPure LC (Roche, Швейцария), Magtration System 12GC (Precision System Science Co., Ltd., Япония), Nucleic Acid Extraction System NP968 (Med Equipment, Китай) и EZ1 Advanced XL system (QIAGEN, Нидерланды); была продемонстрирована их хорошая эффективность [40, 41, 45-47].

## Хранение выделенной ДНК

**Геномная ДНК.** Выделенная ДНК может храниться как при низких температурах ( $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $-80^{\circ}\text{C}$ ,  $-196^{\circ}\text{C}$ ), так и при комнатной температуре — в высушенном виде в присутствии стабилизаторов (DNASTable, GenTegra-DNA) или в виде пятен на бумаге. Длительное хранение экстрагированных образцов ДНК рекомендуется осуществлять при  $-80^{\circ}\text{C}$  или  $-196^{\circ}\text{C}$  (жидкий азот) [14].

В водных растворах (что является удобным форматом для хранения) НК чувствительны к депуринированию, депиримидинированию дезаминированию и гидролизу. Чтобы подавить эту кислотно-катализируемую деградацию ДНК, растворы для хранения образцов ДНК должны являться щелочным буфером (до pH 8,3). Добавление хелатирующих агентов, таких как ЭДТА, в раствор для хранения нуклеиновых кислот в концентрации 500 мМ защищает ДНК от деградации [14].

При сухом хранении НК в присутствии стабилизаторов образец находится в аморфном некристаллическом или стекловидном состоянии, при котором молекулы теряют способность диффундировать, что предотвращает деградацию НК [14]. Хранение при сверхнизких температурах  $-196^{\circ}\text{C}$  вызывает остекловывание НК, поскольку вода превращается в твердый лед, а молекулы теряют способность двигаться. Добавление влаги к сухому образцу или повышение температуры ультраохлажденных образцов выше температуры стеклования воды может привести к повреждению ДНК. Существенным аспектом использования криоконсервации образцов может стать рентабельность хранения [14].

**вкДНК.** Хранение выделенной и растворенной в буфере вкДНК рекомендуется осуществлять в пределах таких же сроков, что и плазмы крови:

при температуре +4° С — трое суток, при температуре -20° С — 3 мес., при -0° С — 9 мес. Причем концентрация вкДНК в буфере с течением времени уменьшается медленнее, чем концентрация вкДНК в плазме. Кроме того, показано, что хранение растворенной вкДНК следует осуществлять в полипропиленовых пробирках [26].

### Контроль качества ДНК

Прежде чем использовать образец ДНК в исследованиях, необходимо удостовериться, что он надлежащего качества. Ключевыми показателями качества ДНК являются двухцепочечность, целостность, чистота образца, присутствие ингибиторов [48]. Измерить показатели качества геномной ДНК можно следующим образом:

**Ингибиторы.** Проверить наличие ингибиторов, препятствующих протеканию ПЦР, и убедиться, что образец пригоден для применения в ПЦР, возможно выполнив анализ SPUD qPCR [48].

**Двухцепочечность.** Проверить двухцепочечность образца можно с помощью спектрофлуориметрии. Если >70% образца является двухцепочечным, “двухцепочечным” можно считать весь образец [48].

**Целостность.** Для определения целостности ДНК обычно используют гель-электрофорез и анализ методом ПЦР. С помощью гель-электрофореза определяют молекулярную массу ДНК; если все полосы >30 кб, это означает, что образец ДНК не подвергся деградации [48].

**Показатель целостности ДНК (DNA integrity number (DIN)).** С помощью микрофлюидного электрофореза можно измерить показатель целостности ДНК, который позволяет дать количественную оценку целостности. Если значение DIN >7, то ДНК хорошего качества [48].

**Чистота.** ДНК имеет максимальное поглощение приблизительно при 260 нм, а белки ~280 нм. Загрязняющие вещества, такие как ЭДТА, углеводы и фенол, имеют максимальное поглощение при длине волны ~230 нм. Следовательно, соотношения поглощения A260/A280 и A260/A230 показывают

степень чистоты НК. Образец ДНК считается чистым, если соотношение A260/A280 составляет от 1,8 до 2,0, а соотношение A260/A230 >2,0. Вместе с тем, образец ДНК с более низким отношением A260/A230 (1,7 ≤A260/A230 <2,0) также считается пригодным для использования в молекулярно-биологических экспериментах. Концентрация ДНК (мкг/мл) рассчитывается как 50×OD260 образца [48].

Для количественной оценки вкДНК наиболее часто используют количественную ПЦР и флуориметрическое определение (краситель PicoGreen и флуориметр Qubit, который наиболее широко используется для подготовки к NGS-секвенированию). Реже для количественной оценки применяется УФ-спектрофотометрия [49].

### Заключение

Современный персонализированный подход в медицине тесно связан с генетическими исследованиями. Накоплено много данных, иногда противоречивых, об использовании различных биоматериалов и методов выделения и хранения ДНК для проведения генетических исследований. Международный опыт показывает, что биобанки становятся ключевыми инфраструктурами для современных генетических исследований и разработок, позволяя оперативно использовать выборки необходимого размера и широкий спектр качественного биоматериала. Качество получаемых биообразцов и выделенной ДНК обеспечивается определенными едиными стандартами биобанкирования для сбора, пробоподготовки и хранения различных видов биоматериала и выделенной ДНК, которые публикуют в профессиональных изданиях и в виде стандартов ISO [50]. Применение регламента биобанкирования повышает, таким образом, эффективность и качество биомедицинских исследований.

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

### Литература/References

- Lappalainen T, Scott AJ, Brandt M, et al. Genomic Analysis in the Age of Human Genome Sequencing. *Cell*. 2019;177:70-84. doi:10.1016/j.cell.2019.02.032.
- Schübeler D. Function and information content of DNA methylation. *Nature*. 2015;517:321-6. doi:10.1038/nature14192.
- Siravegna G, Marsoni S, Siena S, et al. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017;14:531-48. doi:10.1038/nrclinonc.2017.14.
- Hoffmann AR, Proctor LM, Surette MG, et al. The Microbiome: The Trillions of Microorganisms That Maintain Health and Cause Disease in Humans and Companion Animals. *Vet Pathol*. 2016;53:10-21. doi:10.1177/0300985815595517.
- Liang D, Leung RKK, Guan W, et al. Involvement of gut microbiome in human health and disease: Brief overview, knowledge gaps and research opportunities. *Gut Pathog*. 2018;10:3. doi:10.1186/s13099-018-0230-4.
- Anhê FF, Varin TV, Le Barz M, et al. Gut Microbiota Dysbiosis in Obesity-Linked Metabolic Diseases and Prebiotic Potential of Polyphenol-Rich Extracts. *Curr Obes Rep*. 2015;4(4):389-400. doi:10.1007/s13679-015-0172-9.
- Carding S, Verbeke K, Vipond DT, et al. Dysbiosis of the gut microbiota in disease. *Microb Ecol Heal Dis*. 2015;26:26191. doi:10.3402/mehd.v26.26191.
- Chen J, Domingue JC, Sears CL. Microbiota dysbiosis in select human cancers: Evidence of association and causality. *Semin Immunol*. 2017;32:25-34. doi:10.1016/j.smim.2017.08.001.
- Drapkina OM, Kaburova AN. Gut microbiota composition and metabolites as the new determinants of cardiovascular pathology

- development. *Ration Pharmacother Cardiol.* 2020;16(2):277-285. (In Russ.) Драпкина О. М., Кабурова А. Н. Состав и метаболиты кишечной микробиоты как новые детерминанты развития сердечно-сосудистой патологии. *Рациональная фармакотерапия в кардиологии.* 2020;16(2):277-285. doi:10.20996/1819-6446-2020-04-02.
10. Shendure J, Balasubramanian S, Church GM, et al. DNA sequencing at 40: Past, present and future. *Nature.* 2017;550:345-53. doi:10.1038/nature24286.
  11. Doludin YV, Borisova AL, Pokrovskaya MS, et al. Current best practices and biobanking recommendations. *Russ Clinical Laboratory Diagnostics.* 2019;64(12):769-76. (In Russ.) Долудин Ю. В., Борисова А. Л., Покровская М. С. Современные передовые практики и рекомендации по биобанкированию. *Клиническая Лабораторная Диагностика.* 2019;64(12):769-76. doi:10.18821/0869-2084-2019-64-12-769-776.
  12. Anisimov SV, Glotov AS, Granstrem OK, et al. Biobanks and biomedical progress. *Proceedings of scientific works.* ed. by Anisimov SV. St. Petersburg: Svoyo izdatel'stvo. 2018. p. 225. (In Russ.) Анисимов С. В., Глотов А. С., Гранстрем О. К. и др. Биобанки и прогресс биомедицины: Сб. научн. тр. под ред. С. В. Анисимова. Санкт-Петербург: Свое издательство, 2018. с. 225. ISBN 978-5-4386-1648-1.
  13. Anisimov SV, Meshkov AN, Glotov AS, et al. National Association of Biobanks and Biobanking Specialists: New Community for Promoting Biobanking Ideas and Projects in Russia. *Biopreserv Biobank.* 2020; Oct 15. doi:10.1089/bio.2020.0049.
  14. Nasarabadi S, Hogan M, Nelson J. Biobanking in Precision Medicine. *Curr Pharmacol Reports.* 2018;4:91-101. doi:10.1007/s40495-018-0123-8.
  15. Gillespie K, Luft H, Hernandez Y, et al. Patient Views on the Use of Personal Health Information and Biological Samples for Biobank Research. *J Patient-CENtered Res Rev.* 2017;4:171. doi:10.17294/2330-0698.1516.
  16. Gaziano JM, Concato J, Brophy M, et al. Million Veteran Program: A mega-biobank to study genetic influences on health and disease. *J Clin Epidemiol.* 2016;70:214-23. doi:10.1016/j.jclinepi.2015.09.016.
  17. Chen WC, Kerr R, May A, et al. The Integrity and Yield of Genomic DNA Isolated from Whole Blood Following Long-Term Storage at -30°C. *Biopreserv Biobank.* 2018;16:106-13. doi:10.1089/bio.2017.0050.
  18. Bulla A, De Witt B, Ammerlaan W, et al. Blood DNA Yield but Not Integrity or Methylation Is Impacted after Long-Term Storage. *Biopreserv Biobank.* 2016;14:29-38. doi:10.1089/bio.2015.0045.
  19. Björkstén J, Enroth S, Shen Q, et al. Stability of Proteins in Dried Blood Spot Biobanks. *Mol Cell Proteomics.* 2017;16:1286-96. doi:10.1074/mcp.RA117.000015.
  20. Gallego PF, Ortega-Pinazo J, Martinez B, et al. On the Use of Buffy or Whole Blood for Obtaining DNA of High Quality and Functionality: What Is the Best Option? *Biopreserv Biobank.* 2019;17(6):577-82. doi:10.1089/bio.2019.0024.
  21. Bycroft C, Freeman C, Petkova D, et al. The UK Biobank resource with deep phenotyping and genomic data. *Nature.* 2018;562:203-9. doi:10.1038/s41586-018-0579-z.
  22. Bronkhorst AJ, Aucamp J, Pretorius PJ. Cell-free DNA: Preanalytical variables. *Clin Chim Acta.* 2015;450:243-53. doi:10.1016/j.cca.2015.08.028.
  23. Kang Q, Henry NL, Paoletti C, et al. Comparative analysis of circulating tumor DNA stability In K3EDTA, Streck, and CellSave blood collection tubes. *Clin Biochem.* 2016;49:1354-60. doi:10.1016/j.clinbiochem.2016.03.012.
  24. Meddeb R, Pisareva E, Thierry AR. Guidelines for the preanalytical conditions for analyzing circulating cell-free DNA. *Clin Chem.* 2019;65:623-33. doi:10.1373/clinchem.2018.298323.
  25. Rubicz R, Zhao S, Wright JL, et al. Gene expression panel predicts metastatic-lethal prostate cancer outcomes in men diagnosed with clinically localized prostate cancer. *Mol Oncol.* 2017;11:140-50. doi:10.1002/1878-0261.12014.
  26. Risberg B, Tsui DWY, Biggs H, et al. Effects of Collection and Processing Procedures on Plasma Circulating Cell-Free DNA from Cancer Patients. *J Mol Diagnostics.* 2018;20:883-92. doi:10.1016/j.jmoldx.2018.07.005.
  27. Wu WK, Chen CC, Panyod S, et al. Optimization of fecal sample processing for microbiome study — The journey from bathroom to bench. *J Formos Med Assoc.* 2019;118:545-55. doi:10.1016/j.jfma.2018.02.005.
  28. Fouhy F, Deane J, Rea MC, et al. The Effects of Freezing on Faecal Microbiota as Determined Using MiSeq Sequencing and Culture-Based Investigations. *PLoS One.* 2015; 10(3): e0119355. doi:10.1371/journal.pone.0119355
  29. Choo JM, Leong LE, Rogers GB. Sample storage conditions significantly influence faecal microbiome profiles. *Sci Rep.* 2015;5:16350. doi:10.1038/srep16350.
  30. Tedjo DI, Jonkers DMAE, Savelkoul PH, et al. The effect of sampling and storage on the fecal microbiota composition in healthy and diseased subjects. *PLoS One.* 2015;10:e0126685. doi:10.1371/journal.pone.0126685.
  31. Reck M, Tomasch J, Deng Z, et al. Stool metatranscriptomics: A technical guideline for mRNA stabilisation and isolation. *BMC Genomics.* 2015;16:494. doi:10.1186/s12864-015-1694-y.
  32. Hale VL, Tan CL, Knight R, et al. Effect of preservation method on spider monkey (*Ateles geoffroyi*) fecal microbiota over 8 weeks. *J Microbiol Methods.* 2015;113:16-26. doi:10.1016/j.mimet.2015.03.021.
  33. Sinha R, Chen J, Amir A, et al. Collecting fecal samples for microbiome analyses in epidemiology studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2016;25:4-16. doi:10.1158/1055-9965.EPI-15-0951.
  34. Abrahamson M, Hooker E, Ajami NJ, et al. Successful collection of stool samples for microbiome analyses from a large community-based population of elderly men. *Contemp Clin Trials Commun.* 2017;7:158-62. doi:10.1016/j.conctc.2017.07.002.
  35. Anderson EL, Li W, Klitgord N, et al. A robust ambient temperature collection and stabilization strategy: Enabling worldwide functional studies of the human microbiome. *Sci Rep.* 2016;6:31731. doi:10.1038/srep31731.
  36. Jha AR, Davenport ER, Gautam Y, et al. Gut microbiome transition across a lifestyle gradient in Himalaya. *PLoS Biol.* 2018;16:1-30. doi:10.1371/journal.pbio.2005396.
  37. Ma Y, Chen H, Lei R, et al. Biobanking for human microbiome research: promise, risks, and ethics. *Asian Bioeth Rev.* 2017;9:311-24. doi:10.1007/s41649-017-0033-9.
  38. Ali N, Rampazzo R de CP, Costa ADT, et al. Current Nucleic Acid Extraction Methods and Their Implications to Point-of-Care Diagnostics. *Biomed Res Int.* 2017;2017:1-13. doi:10.1155/2017/9306564.
  39. Volckmar AL, Sültmann H, Riediger A, et al. A field guide for cancer diagnostics using cell-free DNA: From principles to practice and clinical applications. *Genes Chromosom Cancer.* 2018;57:123-39. doi:10.1002/gcc.22517.
  40. Bag S, Saha B, Mehta O, et al. An Improved Method for High Quality Metagenomics DNA Extraction from Human and Environmental Samples. *Sci Rep.* 2016;6:26775. doi:10.1038/srep26775.

41. Lim MY, Song EJ, Kim SH, et al. Comparison of DNA extraction methods for human gut microbial community profiling. *Syst Appl Microbiol.* 2018;41:151-7. doi:10.1016/j.syapm.2017.11.008.
42. Mackenzie BW, Waite DW, Taylor MW. Evaluating variation in human gut microbiota profiles due to DNA extraction method and inter-subject differences. *Front Microbiol.* 2015;6:1-11. doi:10.3389/fmicb.2015.00130.
43. Gerasimidis K, Bertz M, Quince C, et al. The effect of DNA extraction methodology on gut microbiota research applications. *BMC Res Notes.* 2016;9:365. doi:10.1186/s13104-016-2171-7.
44. Stinson LF, Keelan JA, Payne MS. Comparison of Meconium DNA extraction methods for use in microbiome studies. *Front Microbiol.* 2018;9:270. doi:10.3389/fmicb.2018.00270.
45. Stadlbauer V, Leber B, Lemesch S, et al. *Lactobacillus casei* Shirota supplementation does not restore gut microbiota composition and gut barrier in metabolic syndrome: A randomized pilot study. *PLoS One.* 2015;10:e0141399. doi:10.1371/journal.pone.0141399.
46. Hamad I, Ranque S, Azhar EI, et al. Culturomics and Amplicon-based Metagenomic Approaches for the Study of Fungal Population in Human Gut Microbiota. *Sci Rep.* 2017;7:16788. doi:10.1038/s41598-017-17132-4.
47. Yanagi H, Tsuda A, Matsushima M, et al. Changes in the gut microbiota composition and the plasma ghrelin level in patients with *Helicobacter pylori*-infected patients with eradication therapy. *BMJ Open Gastroenterol.* 2017;4(1):e000182. doi:10.1136/bmjgast-2017-000182.
48. A guide to qualify your clinical samples [Internet]. Available from: <https://www.findmyassay.com> (03 Dec 2020).
49. Trigg RM, Martinson LJ, Parpart-Li S, et al. Factors that influence quality and yield of circulating-free DNA: A systematic review of the methodology literature. *Heliyon.* 2018;4(7):e00699. doi:10.1016/j.heliyon.2018.e00699.
50. ISO 20387:2018 Biotechnology — Biobanking — General requirements for biobanking. 2018. <https://www.iso.org/standard/67888.html> (03 Dec 2020).