

УДК 543.054:544.169:547.413.5

Высокоэффективный метод одностадийного выделения ДНК для ПЦР-диагностики *Mycobacterium tuberculosis*

Д. В. Капустин^{1*}, А. И. Простякова¹, Я. И. Алексеев^{2,3}, Д. А. Варламов^{2,3}, В. П. Зубов¹,
С. К. Завриев¹

¹Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

²ЗАО «Синтол», 127550, Москва, ул. Тимирязевская, 42

³Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии
РАСХ, 127550, Москва, ул. Тимирязевская, 42

*E-mail: kapustin@ibch.ru

Поступила в редакцию 09.10.2013

После доработки 14.03.2014

РЕФЕРАТ Сравнили эффективность выделения ДНК *Mycobacterium tuberculosis complex* из лизированных образцов мокроты двумя способами с помощью спин-картриджей, содержащих сорбент на основе кремнезема, модифицированного фторопластом и полианилином, и с помощью автоматической системы выделения. Показано, что при одностадийном выделении с использованием сорбента существенно снижаются потери ДНК и обеспечивается большая чувствительность выявления ДНК *M. tuberculosis complex* по сравнению с системой, основанной на сорбции и десорбции нуклеиновых кислот в ходе выделения.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА выделение ДНК, композиционные сорбенты, *Mycobacterium tuberculosis complex*, полианилин, ПЦР-диагностика, фторополимеры.

ВВЕДЕНИЕ

Очищенные препараты нуклеиновых кислот, выделенные из различных биологических источников, все шире применяются в биомедицинских исследованиях (например, при секвенировании, в качестве иммуномодулирующих агентов или противоопухолевых препаратов, при конструировании средств доставки лекарств и т.д.), особенно в биоанализе и медицинской диагностике, во многом благодаря успешному развитию ПЦР-технологии. Эффективность методов подготовки пробы зависит от разработки быстрых и воспроизводимых способов выделения ДНК, непосредственно пригодной для ПЦР-диагностики. Описаны различные методы выделения нуклеиновых кислот, доступны коммерческие наборы, которые соответствуют задаче выделения и используются как при решении исследовательских задач, так и в клинической практике. Впервые применять частицы кремнезема для сорбции ДНК в присутствии хаотропной соли предложили еще в 1979 г. [1], в 1990 г. этот метод был усовершенствован [2], и его различные варианты используются по сей день. Ши-

рокое распространение получили методы выделения нуклеиновых кислот с использованием магнитных частиц на основе кремнезема [3], волокон, модифицированных кремнеземными частицами [4], аффинных кремнеземных частиц [5] и т.д.

Как правило, методы разделения и выделения биополимеров основаны на различиях в растворимости нуклеиновых кислот, белков и полисахаридов. Сущность этих методов заключается в «улавливании» целевого биополимера сорбентом из смеси и его удерживании на первом этапе разделения, отмывке от примесей и элюции целевого компонента с поверхности сорбента на следующих этапах. Таким образом, процедуры выделения многостадийны, трудоемки, требуют значительных временных затрат, трудно автоматизируются и не всегда обеспечивают достаточную для проведения эффективного ПЦР-анализа степень чистоты выделяемой ДНК. Последнее, как правило, зависит от присутствия в образце ингибиторов ПЦР (например, гема в образцах крови, различных типов хлорофилла в лизатах растительной ткани, гуминовых кислот в образцах почвы и т.д.).

Очевидно, что более привлекательной и перспективной является одностадийная схема выделения. В этом случае выделяемый (и одновременно очищаемый) биополимер проходит через слой сорбента, не удерживаясь на его поверхности, в то время как мешающие ПЦР примеси эффективно удерживаются сорбентом. Несколько лет назад мы разработали одностадийную процедуру выделения ДНК, основанную на использовании уникальных сорбционных свойств некоторых полимеров, а именно фторполимеров (ФП) [6] и полианилина (ПАНИ) [7, 8]. Покрытия из таких полимеров, например, сформированные на поверхности пористого кремнезема, не удерживают ДНК, но адсорбируют белки и ингибирующие ПЦР компоненты, присутствующие в типичных биологических образцах (бактериальные или растительные лизаты, мазки, плазма, кровь и т.д.).

Нами разработан ряд методов синтеза фторполимер- и ПАНИ-содержащих композиционных сорбентов на основе различных физико-химических процессов [9, 10]. Как фторполимеры, так и ПАНИ, применяемые в качестве модификаторов поверхности сорбентов, обеспечивают одностадийное выделение нуклеиновых кислот из сложных биологических смесей, однако каждый из этих полимерных модификаторов привносит дополнительные существенные полезные свойства. Так, фторполимерсодержащие сорбенты отличаются исключительной химической стойкостью, низким уровнем неспецифической сорбции и, как правило, обеспечивают наиболее высокий выход ДНК. В свою очередь, ПАНИ-содержащие сорбенты, демонстрирующие превосходную смачиваемость и высокую поверхностную емкость, могут с успехом применяться для выделения ДНК из «сложных» биологических смесей (кровь, лизаты растительной ткани, экстракты почвы и т.д.), а также для разделения нуклеиновых кислот в зависимости от их вторичной структуры.

В этой связи особый интерес представляют материалы, модифицированные нанослоями фторполимера и ПАНИ одновременно. Ранее мы докладывали об успешном применении такого материала для одностадийного выделения преимущественно двухцепочечной ДНК вируса гепатита В человека и одноцепочечной ДНК вируса ТТВ (*Transfusion transmitted virus, Torque teno virus* – вирус, передающийся при переливании крови), пригодных для ПЦР-анализа, из образцов плазмы крови человека [11]. Однако до сих пор применимость таких сорбентов для экспресс-выделения ДНК патогенов человека не вирусной природы из клинических образцов изучена недостаточно. В настоящей статье рассмотрено применение кремнеземного сорбента, модифицированного комбинацией нанослоев фторопласта ФП и ПАНИ,

для одностадийного выделения ДНК из инактивированных клинических образцов мокроты, содержащих различное количество клеток возбудителей туберкулеза человека, объединенных под общим названием «микобактерии туберкулезного комплекса» (МТК – *M. tuberculosis complex*) и включающих такие виды микобактерий, как *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canettii*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. mungi*.

Эффективность одностадийного выделения ДНК с помощью картриджей, содержащих ФП-ПАНИ-сорбент, сравнивали с автоматизированным многостадийным методом выделения ДНК МТК, разработанным ЗАО «Синтол» (Москва, Россия) на основе роботизированной станции Tecan Freedom EVO® PCR (Tecan Trading AG, Швейцария).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Анилин (марки «ос.ч.», Aldrich, Германия) перегоняли, отбирая фракции с n_d^{20} 1.5863 в диапазоне температур 182–184°С. Персульфат аммония (Rotipuran®, Германия), соляная кислота, этанол – марки «х.ч.» (Aldrich, Германия); вода – стандарт Milli Q.

ДНК микобактерий туберкулеза из образцов мокроты выделяли с использованием пластиковых спин-картриджей, содержащих по 100 мг сорбента Si-500-ФП-ПАНИ, а также с помощью автоматической роботизированной станции Tecan Freedom EVO® PCR (Tecan Trading AG, Швейцария), адаптированной для набора «М-Сорб-Туб-Автомат» (ЗАО «Синтол», Россия), применяемого для автоматического выделения ДНК. Образцы мокроты лизировали, используя реагенты, входящие в состав набора «АмплиТуб-РВ» (ЗАО «Синтол», Россия), предназначенного для качественного и количественного определения микобактерий туберкулезного комплекса методом ПЦР в реальном времени (лизирующий реагент В+, разбавитель, инактивирующий реагент А).

В работе использовали следующее дополнительное оборудование: центрифугу для микропробирок Циклотемп-903; термостат Циклотемп-303; микроцентрифугу-встряхиватель для микропробирок Циклотемп-901 (все оборудование производства ЗАО «Циклотемп», Россия); микропипетки переменного объема на 20, 200, 1000 мкл; штатив для пробирок объемом 1.5 мл; микропробирки объемом 1.5 мл; наконечники к микропипеткам.

Получение ФП-ПАНИ-сорбента

Кремнезем Si-500 (100 г) вакуумировали в специальном реакторе в течение 30–40 мин, затем к носителю добавляли 500 мл 0.016% раствора ФП в ацетоне. Реактор, содержащий суспензию частиц кремнезема, инкубировали в ультразвуковой ванне при атмос-

ферном давлении в течение 15 мин. Затем растворитель удаляли на роторном испарителе при 40–45°C. В реактор вводили вторую порцию раствора полимера в ацетоне (500 мл) и повторяли манипуляции, следующие за введением первой порции раствора полимера. Полученный продукт сушили в вакууме до постоянного веса и использовали в качестве носителя при проведении окислительной полимеризации анилина как описано в [11].

Протокол выделения микобактериальной ДНК с помощью картриджей, содержащих ФП-ПАНИ-сорбент

Инактивация. В экспериментах использовали модельные и клинические образцы мокроты. Для инактивации модельных образцов к 500 мкл мокроты, содержащей 600 КОЕ МТК/мл (в частности, *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG и др.), добавляли 500 мкл инактивирующего реагента А. Все клинические образцы также предварительно инактивировали. Для этого к образцам мокроты, отобраным в 50-мл пробирки, добавляли инактивирующий реагент А до конечного объема 40 мл. Содержимое пробирки перемешивали, плавно переворачивая, до полной гомогенизации, а затем выдерживали в течение 30 мин. Пробирки центрифугировали (15 мин при 3500 об/мин). Супернатант сливали, осадок ресуспендировали и переносили в пробирки объемом 1.5 мл.

Лизис. Пробирки с исследуемым материалом центрифугировали (5 мин при 13000 об/мин), супернатант удаляли и добавляли 100 мкл лизирующего реагента В+. Содержимое пробирок тщательно перемешивали на микроцентрифуге-встряхивателе и инкубировали в течение 10 мин при 75°C. Пробирки центрифугировали на микроцентрифуге-встряхивателе 15 с. Полученную ДНК использовали в ПЦР, применяя наборы реагентов для обнаружения микобактерий туберкулезного комплекса «АмпЛиТуб-РВ» (для ручного выделения ДНК) и «М-Сорб-Туб-Автомат» (для автоматического выделения ДНК).

Очистка ДНК. В пробирки с образцами вносили по 400 мкл разбавителя, перемешивали, плавно пипетируя, содержимое наносили на картриджи с сорбентом, вставленные в пробирки-приемники. Центрифугировали в течение 1 мин при 4000 об/мин. Картриджи удаляли из приемников.

ПЦР в реальном времени. ПЦР в реальном времени проводили, используя анализатор АНК-32 (Институт аналитического приборостроения РАН, Россия) и соответствующий алгоритм, разработанный в ЗАО «Синтол». Используемый метод диагностики позволяет определять наличие в образце специфиче-

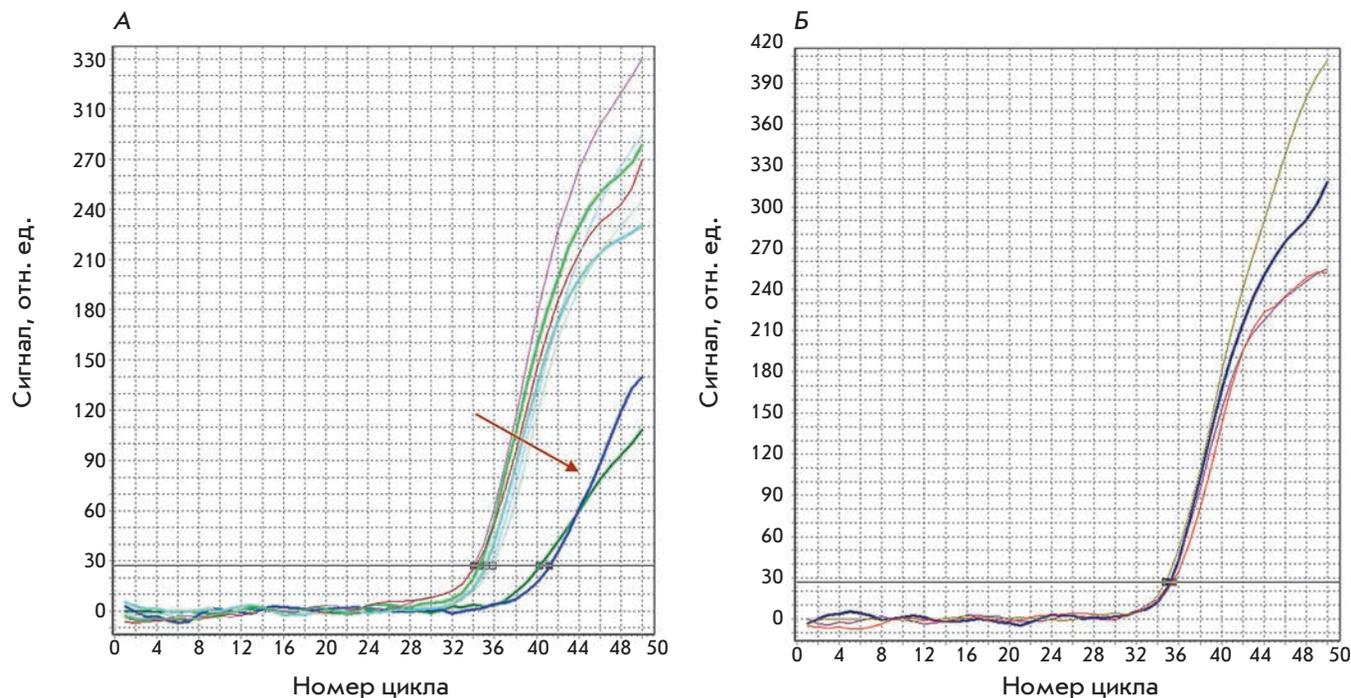
ских фрагментов ДНК гена IS6110, который присутствует во множестве копий в большинстве штаммов МТК, но при этом может отсутствовать в геноме *M. tuberculosis*. Одновременно метод позволяет определять количество специфического фрагмента ДНК *regX*, представленного в геноме МТК одной копией.

Условия проведения ПЦР с применением выделенных ДНК были идентичными.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Эксперименты по выделению микобактериальной ДНК из контрольных модельных и клинических образцов мокроты проводили в ЗАО «Синтол» (Москва, Россия). Сравнивали эффективность выделения ДНК из лизированных образцов мокроты двумя способами: с помощью картриджей, содержащих ФП-ПАНИ-сорбент, и с помощью автоматической системы выделения, созданной на базе роботизированной станции Tecan Freedom EVO® PCR (Tecan Trading AG, Швейцария). В последнем случае процедура выделения ДНК была основана на сорбции молекул нуклеиновой кислоты возбудителя туберкулеза на магнитных частицах, содержащих на поверхности олигонуклеотиды, последовательность нуклеотидов которых была комплементарной последовательности мишени в ДНК возбудителя. В результате в обеспечиваемых системой условиях ДНК возбудителя комплементарно связывается с поверхностью носителя. Затем автоматически проводятся удаление несвязанных с магнитными частицами примесей (включая ДНК, не содержащие последовательность-мишень) и элюция очищенной ДНК с поверхности магнитных частиц. Таким образом, в автоматизированной системе реализуется многостадийный процесс выделения ДНК, в то время как при использовании ФП-ПАНИ-сорбента осуществляется одностадийное выделение бактериальной ДНК. Выделенные препараты ДНК анализировали методом ПЦР в реальном времени. Таким образом оценивали эффективность амплификации ПЦР-фрагментов ДНК после одностадийного выделения с помощью ФП-ПАНИ-сорбента и после автоматического многостадийного выделения. Исследовали модельные образцы мокроты, содержащие 600 КОЕ/мл, и клинические образцы, полученные от случайно отобранных пациентов.

Результаты тестирования модельных образцов, представлены на *рисунке*, а также в *табл. 1*. Из *рисунка* видно, что эффективность амплификации ПЦР-фрагментов ДНК, не подвергнутых дополнительной очистке на картриджах с сорбентом (т.е. исходных неочищенных лизатов), заметно снижена (кривые, обозначенные стрелкой на *рис. А*, образец «исходный лизат» в *табл. 1*). Однако после разведения таких образцов эффективность амплификации



Результаты ПЦР в реальном времени с использованием микобактериальной ДНК, выделенной с помощью ФП-ПАНИ-сорбента из лизатов модельных образцов мокроты, содержащих 600 КОЕ/мл. А – стрелка указывает на кривые, полученные при использовании неочищенных на сорбенте образцов (исходные лизаты). Б – красная и коричневая кривые – образцы, очищенные с помощью ФП-ПАНИ-сорбента; синяя кривая – образец исходного лизата после разбавления без дополнительной очистки с помощью ФП-ПАНИ-сорбента

восстанавливается (за счет понижения относительной концентрации ингибиторов ПЦР в анализируемой пробе), и количество ПЦР-фрагментов становится сопоставимым с количеством ампликонов, полученных на образцах ДНК, очищенных с помощью ФП-ПАНИ-сорбента (рис. Б, образец «разбавленный лизат» в табл. 1). В табл. 1 также приведены контрольные значения порогового цикла и относительной концентрации ДНК для образцов с известным количеством ДНК (10^7 , 10^5 , 10^3 , 10^2 КОЕ соответственно). Видно, что использование ФП-ПАНИ-сорбента не снижает чувствительность ПЦР-детекции и позволяет определять порядка 10 копий анализируемой ДНК в пробе. Таким образом, ФП-ПАНИ-сорбент обеспечивает эффективное удаление ингибиторов ПЦР и сохранение исходного количества ДНК в исследуемом образце. На основании полученных данных можно предположить, что ФП-ПАНИ-содержащий материал будет эффективен при одностадийном выделении ДНК из клинических образцов, обеспечивая получение очищенного препарата нуклеиновых кислот, пригодного для проведения ПЦР-анализа.

Для подтверждения данного предположения сравнивали количество ДНК, выделенной из клинических

образцов, с помощью ФП-ПАНИ-сорбента и с использованием автоматической системы. Количество исходного материала для автоматической системы в 2 раза превышало количество, взятое для выделения на картриджах. Однако с учетом того, что при автоматическом выделении используется только половина взятого объема, количество исходного материала в обоих случаях сопоставимо. При применении автоматической системы конечный объем раствора ДНК был в 4 раза меньше, а объем, требуемый для проведения ПЦР, в 2.5 раза больше, чем при выделении ДНК на картриджах. Таким образом, количество ДНК для проведения ПЦР в автоматической системе в 10 раз превышало количество ДНК, взятой в ПЦР, после ручного выделения с помощью картриджей.

В табл. 2 приведено количество ПЦР-фрагментов ДНК микобактерий, полученное в ходе анализа клинических образцов обоими способами, а также количество ДНК, определенное в ходе автоматической амплификации с учетом разведений.

Из данных табл. 2 следует, что эффективность автоматического выделения ДНК составила от 0.3 до 7% по сравнению с выделением с использованием ФП-ПАНИ-сорбента.

Таблица 1. Значения порогового цикла и рассчитанное количество копий ДНК в модельных образцах после проведения ПЦР в реальном времени

Образец	Пороговый цикл, Ct	Рассчитанное количество копий ДНК
Исходный лизат	40.2	0.4
Исходный лизат	41.03	0.22
Разбавленный лизат	35.23	13.72
1	35.28	13.19
2	34.27	27.10
3	33.77	38.50
4	33.70	40.41
5	35.69	9.84
6	35.28	13.19
7	35.04	15.69
8	34.66	20.48
9	35.08	15.24
Контрольные разведения		
10000000	16.20	9.948E6
100000	21.58	2.193E5
1000	29.14	1026.34
100	32.45	97.94

Примечание. 1 – 9 – модельные образцы мокроты, содержащие 600 КОЕ/мл после пропускания через картридж, содержащий ФП-ПАНИ-сорбент.

Таким образом, использование сорбента, модифицированного комбинацией нанослоев ФП и ПАНИ, существенно снижает потери ДНК и обеспечивает значительно большую чувствительность выявления ДНК *M. tuberculosis* по сравнению с системой, основанной на сорбции и десорбции нуклеиновых кислот в ходе выделения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как правило, в методах выделения нуклеиновых кислот из биологических смесей реализуются три различных физико-химических процесса: экстракция, осаждение или адсорбция целевого компонента (нуклеиновой кислоты) на поверхности сорбента с последующей отмывкой от примесей и десорбция. Перечисленные процедуры трудоемки и часто сопровождаются значительными потерями выделяемой нуклеиновой кислоты.

Эффективной альтернативой многостадийным протоколам выделения нуклеиновых кислот представляется одностадийная схема с применением специальных сорбентов. При этом нуклеиновая кислота не удерживается сорбентом, в то время как содержащиеся в исходной смеси примеси (прежде всего, ингибиторы ПЦР) прочно адсорбируются. Благодаря уникальным сорбционным свойствам некоторых синтетических полимеров, таких, как фторполимеры и ПАНИ, удалось разработать ряд композиционных сорбентов, обеспечивающих одностадийное выделение нуклеиновых кислот из сложных биологических смесей, отличающихся высокой селективностью при разделении нуклеиновых кислот и белков. Особый интерес представляет исследование сорбционных свойств сорбента, последовательно модифициро-

Таблица 2. Количество ПЦР-фрагментов ДНК *M. tuberculosis complex* после картриджного и автоматического выделения ДНК из клинических образцов

Образец	Количество ДНК, копий/объем		
	Картриджи, 10 мкл	Автоматическое выделение, 25 мкл	Автоматическое выделение, после разбавления
1	4579	3254	325
2	65	Не определено	Не определено
3	5006	3572	357
4	Не определено	Не определено	Не определено
5	733220	23693	2369
6	98	3	< 1
7	12	2	< 1
8	178	32	3

ванного нанослоями ФП и ПАНИ. В таком материале сочетаются высокая химическая стойкость за счет наличия фторполимерного покрытия и высокая сорбционная емкость, определяемая свойствами ПАНИ-покрытия.

В настоящей работе на примере выделения ДНК *M. tuberculosis* из клинических образцов мокроты показано, что сорбент, модифицированный комбинацией нанослоев ФП и ПАНИ, эффективно удаляет ингибиторы ПЦР и обеспечивает сохранение исходного

количества ДНК, присутствующего в образце. Благодаря этому достигается большая чувствительность выявления ДНК *M. tuberculosis complex* по сравнению с системой, основанной на сорбции и десорбции нуклеиновых кислот в ходе выделения. ●

*Работа частично поддержана грантом
Европейской комиссии DIAGNOSIS
(договор № LSHB-CT-037212).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Vogelstein B., Gillespie D. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. P. 615–619.
2. Boom R., Sol C.J.A., Salimans M.M.M., Jansen C.L., Wertheim-van Dillen P.M.E., van der Noordaa J. // J. Clin. Microbiol. 1990. V. 28. P. 495–503.
3. Park M.E., Chang J.H. // Mater. Sci. Eng. C. Biomimetic and Supramolecular Systems. 2007. V. 27. № 5–8. P. 1232–1235.
4. Cady N.C., Stelick S., Batt C.A. // Biosens. Bioelectron. 2003. V. 19. P. 59–66.
5. Craig J.M., Kraus J., Cremer T. // Hum. Genet. 1997. V. 100. P. 472–476.
6. Kapustin D.V., Saburov V.V., Zavada L.L., Evstratov A.V., Barsamyan G.B., Zubov V.P. // Rus. J. Bioorgan. Chem. 1998. V. 24. P. 770–777.
7. Kapustin D.V., Yagudaeva E.Yu., Zavada L.L., Zhigis L.S., Zubov V.P., Yaroshevskaya E.M., Plobner L., Leiser R.-M., Brem G. // Rus. J. Bioorgan. Chem. 2003. V. 29. P. 281–285.
8. Yagudaeva E.Yu., Muysdinov M.R., Kapustin D.V., Zubov V.P. // Rus. Chem. Bull. Int. Ed. 2007. V. 56. № 6. P. 1166–1173.
9. Kapustin D., Prostyakova A., Bryk Ya., Yagudaeva E., Zubov V. // Nanocomposites and polymers with analytical methods / Ed. Cuppoletti J. Croatia: Intech 2011. P. 83–106.
10. Kapustin D.V., Prostyakova A.I., Ryazantsev D.Yu., Zubov V.P. // Nanomedicine. 2011. V. 6. № 2. P. 241–255.
11. Kapustin D., Prostyakova A., Zubov V. // Zing Conferences. Polymer Chemistry Conference. 12–16 November 2012. Cancun. Mexico. Stow Cum Quy, UK, 2012. P. 42.