

Современные подходы к решению задач по подготовке проб к анализу методом полимеразной цепной реакции

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

УДК 57.088.2

<https://doi.org/10.35825/2587-5728-2021-5-3-236-246>

М.С. Тихвинский, А.А. Воробьев, Я.А. Кибирев,

Г.С. Усенко, А.И. Козлов, С.Г. Исупов

Филиал федерального государственного бюджетного учреждения «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации (г. Киров), 610000, Российская Федерация, г. Киров, Октябрьский проспект, д. 119

Поступила 03.08.2020 г. Принята к публикации 23.09.2021 г.

Чувствительность, специфичность и воспроизводимость молекулярно-генетических методов анализа во многом зависят от качества предварительной подготовки анализируемых образцов. В ходе пробоподготовки решаются задачи обеззараживания патогенного материала, лизирования клеточных мембран, удаления соединений, и примесей ингибирующих полимеразную цепную реакцию (ПЦР), а также концентрирования нуклеиновых кислот. Цель работы – выбор современных подходов к подготовке проб к анализу методом ПЦР. Среди многообразия различных способов подготовки проб наибольшее распространение получили методы, основанные на химическом лизисе клеточных мембран с применением хаотропных соединений, с последующей очисткой нуклеиновых кислот твердофазной экстракцией с применением магнитных частиц. Этот подход реализован как в коммерческих наборах реагентов для ручной пробоподготовки, так и в различных автоматизированных системах для выделения нуклеиновых кислот. Анализ серийно выпускаемых станций для выделения нуклеиновых кислот, показал, что их технические характеристики схожи: продолжительность одного цикла выделения 40–90 мин; Объем анализируемых проб – от 0,1 до 2,0 мл; количество одновременно обрабатываемых проб max – 96, min – 8. Метод выделения нуклеиновой кислоты – магнитные частицы. Основные различия заключаются по виду анализируемых образцов, и технологий лизиса исследуемого материала и экстракции ДНК. Наш опыт применения содержащих магнитные частицы наборов для выделения нуклеиновых кислот, как в стационарных лабораториях, так и в полевых условиях, в частности, при эксплуатации многофункционального мобильного модульного комплекса «Сыч», подтверждает эффективность и надежность этой технологии. Дальнейшее развитие и совершенствование аппаратного обеспечения таких работ будет, очевидно, направлено на миниатюризацию оборудования, разработку полевых портативных автоматических станций выделения нуклеиновых кислот, а также интеграцию процесса подготовки проб и их анализа методом ПЦР в одном устройстве.

Ключевые слова: автоматизированные системы; идентификация; комплекс «Сыч», лизис; нуклеиновые кислоты; патогены; подготовка проб; полимеразная цепная реакция; экстракция.

Библиографическое описание: Тихвинский М.С., Воробьев А.А., Кибирев Я.А., Усенко Г.С., Козлов А.И., Исупов С.Г. Современные подходы к решению задач по подготовке проб к анализу методом полимеразной цепной реакции // Вестник войск РХБ защиты. 2021. Т. 5. № 3. С. 236–246. <https://doi.org/10.35825/2587-5728-2021-5-3-236-246>

За последние годы идентификация патогенов с использованием полимеразной цепной реакции с регистрацией в режиме реального времени (ПЦР-РВ) стала общепризнанным «золотым стандартом» среди многочисленных методов анализа [1–4]. В немалой степени это-

му способствовала высокая чувствительность ПЦР: теоретически, для получения положительного результата достаточно, чтобы в реакционную смесь попал хотя бы один фрагмент молекулы нуклеиновой кислоты, содержащий последовательность, специфичную для иско-

мого возбудителя. Для большинства серийно выпускаемых ПЦР-тест-систем чувствительность анализа, как правило, составляет 100-1000 ген-эквивалентов в 1 мл, что значительно превосходит показатели диагностических наборов, основанных на других методах. Но такая высокая чувствительность метода может быть достигнута только при анализе высокоочищенных препаратов нуклеиновой кислоты. В то же время большая часть образцов, исследуемых в ПЦР специалистами подразделений войск РХБ защиты, представляет собой пробы сложного компонентного состава, содержащие значительное количество мешающих анализу примесей (вода, почва, смывы с поверхностей различных объектов и т.п.). Более того, даже чистые культуры возбудителей инфекционных заболеваний не пригодны для непосредственного анализа: необходимо разрушить все мембранные структуры клеток, инактивировать внутриклеточные нуклеазы, удалить ингибирующие полимеразу компоненты питательной среды и т.д. [5, 6].

Соответственно, обязательным предварительным этапом при постановке ПЦР, от которого в значительной степени зависит результат исследований, является пробоподготовка, основными задачами которой являются обеззараживание исследуемого материала, лизирование мембранных структур, удаление «балластных» соединений (белки, жиры, углеводы, органические и неорганические вещества) и концентрирование пробы.

Цель работы – выбор современных подходы к подготовке проб к анализу методом ПЦР.

Большинство известных протоколов ПЦР имеет определенную стадийность и выполняется в виде ряда последовательных этапов, первым из которых является лизирование мембран бактериальных клеток с высвобождением нуклеиновых кислот. Разрушение мембран обеспечивается за счет химического, физического и/или ферментативного воздействия на исследуемый образец. При этом лизис, помимо высвобождения нуклеиновых кислот, способствует также и обеззараживанию пробы [7].

Наиболее распространенными в настоящее время являются методы химического лизиса, основанные на применении различных поверхностно-активных веществ и хаотропных соединений, обеспечивающих как разрушение мембран, так и инактивацию ферментов с целью максимального сохранения нуклеиновых кислот в пробе. Одна из первых описанных методик разрушения клеток – выделение «нуклеина» Фридрихом Мишером в 1869 г. щелочным

лизисом – относится именно к химической деструкции мембран [8].

К числу наиболее часто применяемых на первом этапе подготовки проб к анализу химических веществ, относится гуанидина тиоцианат. Воздействие данного соединения на бактериальные клетки приводит к быстрому лизированию клеточных мембранных структур и денатурации клеточных белков, включая эндонуклеазы. Высокая эффективность применения данного соединения при проведении пробоподготовки нашла свое отражение и в нормативных документах: для обеззараживания большинства видов проб, содержащих микроорганизмы I-II групп патогенности, действующие Санитарные правила требуют применения лизирующих растворов, содержащих именно это соединение¹.

Физические методы лизиса включают в себя механическое разрушение клеток (перетирание в ступке, измельчение на специальных мельницах, компрессионная гомогенизация и т.д.), ультразвуковую дезинтеграцию, многократные циклы замораживания-оттаивания и некоторые другие способы [9]. Необходимо отметить, что данный способ лизирования редко применяется самостоятельно в силу ряда недостатков. Так, например, механическое воздействие практически не влияет на активность эндонуклеаз, которые приводят к быстрой деградации нуклеиновых кислот. В то же время, как дополнение к химическому методу, механическая обработка значительно повышает эффективность высвобождения нуклеиновых кислот, особенно при анализе проб, содержащих крупные нерастворимые включения (образцы почвы, продукты питания, биоптаты и т.п.).

Ферментативный лизис использует лизоцим, в отношении которого показана высокая эффективность разрушения бактериальных клеточных стенок. В силу ряда причин (меньшая в сравнении с другими методами эффективность, дороговизна) область применения ферментативного лизиса ограничена преимущественно научно-исследовательской работой.

На следующем этапе подготовки проб к анализу молекулярно-генетическими методами осуществляют экстракцию нуклеиновых кислот из полученного лизата и максимально возможное удаление ингибирующих ПЦР примесей. При этом такие ингибиторы могут быть как из состава анализируемого образца (органические соединения большинства известных классов), так и входить в состав реагентов, используемых при лизисе и выделении (этанол, изопропанол и другие спирты, фенол, этилен-

¹ Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)».

диаминтетрауксусная кислота, додецилсульфат натрия и другие поверхностно-активные соединения и т.д.). Влияние на полимеразную цепную реакцию способны оказывать также и неорганические соединения, попавшие реакционную смесь, даже такие «безобидные», как, например, соли натрия, калия или магния [10-13].

Основные методы очистки нуклеиновых кислот по своим физическим и биохимическим особенностям подразделяются на две большие группы: жидкофазные и твердофазные [8, 14]².

Одним из первых и, вероятно, наиболее распространенных вариантов очистки нуклеиновых кислот в системах «жидкость-жидкость» является классический способ фенол-хлороформной экстракции. При объединении лизата со смесью фенола и хлороформа образуется нуклеиновые кислоты концентрируются в водной фазе, а большая часть «балластных» компонентов – белки, липиды, углеводы, а также клеточный дебрис – переходят в органическую фазу. Позднее были разработаны и другие варианты и модификации метода жидко-жидкостной экстракции, в частности, для снижения пенообразования и улучшения разделения водной и органической фаз было предложено включать в состав экстрагирующего реагента изоамиловый спирт. Положительный эффект был показан и при использовании хаотропных агентов, например, тиоцианата гуанидина [15–18].

В то же время, необходимо отметить, что, несмотря на кажущуюся простоту, жидкофазная экстракция является достаточно трудоемким и времязатратным методом, требовательным к квалификации персонала для получения воспроизводимых результатов, а большинство используемых реактивы относятся к высокотоксичным. В связи с этим, в последние годы такие способы выделения нуклеиновых кислот вне научных лабораторий используются все реже, уступая позиции твердофазной экстракции.

Данный метод основан на связывании растворенных аналитов с твердой фазой за счет различных видов межмолекулярного взаимодействия (водородные связи с гидрофильной матрицей, ионные, аффинные), с последующим удалением (отмывкой) остальных компонентов пробы [9, 16]. Наборы реагентов, реализующих твердофазный принцип экстракции, выпускаются в различных вариантах, таких как шприцевые фильтры, картриджи, колонки, планшеты с сорбентом, а также в виде суспензии частиц, предполагающей самостоятельный выбор емкости с учетом имеющегося оборудования и масштабов исследований.

Наибольшее распространение получили твердые фазы, представляющие собой материалы на основе диоксида кремния, такие как стеклянные (кварцевые) шарики, диатомовая земля, измельченный силикагель, стекловолокно и т.д.; количество коммерчески доступных наборов с сорбентом на основе диоксида кремния исчисляется сотнями [19].

Такая популярность твердофазного метода связана с тем, что отрицательно заряженные в водных растворах молекулы нуклеиновых кислот, как ДНК, так и РНК, обладают способностью обратимо связываться с положительно заряженной поверхностью таких матриц. Для облегчения связывания в состав используемых для экстракции реагентов включают нарушающие ассоциацию нуклеиновых кислот с водой хаотропные соединения (гуанидина тиоцианат, мочевины, иодид натрия и т.д.). Специфичность и сила связывания обеспечивают получение препаратов нуклеиновых кислот очень высокой чистоты.

Наиболее распространенным форматом наборов для твердофазной экстракции на таких матрицах был колоночный вариант. Примечательно, за последние несколько лет он был практически полностью вытеснен из лабораторной практики в пользу магнитных частиц, что стало результатом освоения их массового производства и значительного снижения себестоимости. Еще одним достоинством наборов для «магнитной экстракции» стало меньшее число операций и используемых компонентов, а также минимальные требования к приборному оснащению [20].

В настоящее время серийно выпускаются магнитные частицы не только на основе диоксида кремния. В качестве материала может использоваться также целлюлоза, полистирол, окись железа с модифицированной поверхностью, а также различные полимерные соединения, в том числе с иммобилизованными аффинными лигандами [16, 19, 21].

Большинство наборов для экстракции нуклеиновых кислот с использованием магнитных частиц предполагают достаточно небольшое число относительно простых операций. После предварительного обеззараживания и лизиса пробы к ней добавляется суспензия магнитных частиц, связывающих нуклеиновые кислоты. Далее с помощью постоянного магнита, который прижимают к внешней стороне пробирок с пробями, удерживают частицы на стенке, после чего обычной пипеткой удаляют из пробирок содержащий «балластные» веще-

² В рамках данной статьи не рассматриваются некоторые способы выделения и очистки нуклеиновых кислот, например, центрифугирование в градиенте плотности, имеющие в настоящее время сугубо научное и/или историческое значение.

ства лизат и выполняют необходимые промывки и элюирование. Общая продолжительность всех стадий данного этапа обычно составляет всего несколько десятков минут [22–24].

Более того, некоторые варианты магнитных частиц, например, набор «Dynabeads DNA DIRECT», выпускаемый компанией «Invitrogen», не требует обязательного этапа элюции перед проведением ПЦР, что позволило сократить продолжительность этапа экстракции до 10 мин³.

Вышеописанные методы предполагают сорбцию нуклеиновых кислот и удаление примесей. В то же время известны подходы, при которых целевой аналит остается в свободной растворенной форме. К числу таких сорбентов относятся, в частности, хелатообразующие смолы, например «Chelex 100» производства компании «Bio-Rad Laboratories, Inc.». Этот сорбент, представляющий собой частицы сополимера стирола и дивинилбензола, содержащие иминодиацетатные группы, обладает способностью связывать ионы магния и кальция, что приводит к инактивации эндонуклеаз. Смола добавляется непосредственно к анализируемой пробе, после лизирования кипячением большинство «балластных» примесей сорбируется на поверхности частиц; нуклеиновые кислоты остаются в супернатанте и могут быть отделены простым центрифугированием [24, 26].

Многие методы, описанные выше, нашли свою реализацию в составе полуавтоматических и автоматических устройств для выделения и очистки нуклеиновых кислот. Возможность минимизировать участие оператора в процессе подготовки проб к анализу и, соответственно, уменьшить риск ошибок, связанных с «человеческим фактором», стала основной причиной того, что в последние годы наметилась устойчивая тенденция к расширению номенклатуры такого оборудования.

К настоящему времени на рынке представлены большое количество серийно выпускаемых станций для выделения нуклеиновых кислот, различающихся по виду анализируемых образцов, а также применяемым методикам лизиса и экстракции. Существуют решения с различным уровнем участия оператора, от полуавтоматических систем до полных автоматов и роботизированных установок [23, 24, 27]. Описание наиболее интересных образцов представлено далее.

Японская компания «Kurabo» выпускает серию приборов для очистки нуклеиновых кислот, различающихся как производительностью,



Рисунок 1 – Система для выделения нуклеиновых кислот «QuickGene-810»



Рисунок 1 – Прибор для автоматического выделения нуклеиновых кислот «QIACube»¹

¹ URL: <https://www.helicon.ru/upload/iblock/1a8/1a89d6de609085ef1761268960a9e059.jpg> (дата обращения: 08.07.2021)

так и степенью автоматизации⁴. Общим для всех установок является использование разработанных компанией картриджей с ультратонкой полимерной гидрофильной мембраной, селективно сорбирующей ДНК и РНК. Одна из выпускаемых моделей, «QuickGene-810» (рисунок 1), способна в автоматическом режиме произвести очистку до 8 образцов в течение 15 мин (рисунок 1).

Анализ образцов с использованием станций серии «QuickGene» требует предварительной ручной гомогенизации и лизирования. В отличие от них, установки серии «Gene Prep Star», выпускаемые этим же производителем, характеризуются большим уровнем автоматизации и производительности (старшая модель, «Gene Prep Star PI-1200A», способна обрабатывать до 384 образцов за один запуск).

Фирма «QIAGEN» предлагает несколько станций для автоматического выделения ну-

³ Dynabeads™ DNA DIRECT™ Universal Kit URL: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/63006#/63006> (дата обращения: 05.07.2020).

⁴ Nucleic acid extraction system URL: <https://www.kurabo.co.jp/bio/English/product/products.php?M=L&A=P&CID=1> (дата обращения: 05.07.2020).

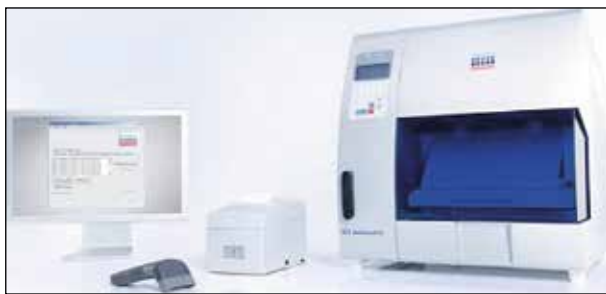


Рисунок 3 – Установка «EZ1 Advanced XL»



Рисунок 4 – Автоматизированная станция выделения нуклеиновых кислот «QIASymphony»¹

¹ URL: <https://www.helicon.ru/upload/iblock/0bc/0bc35fb2b9aceb390c18c87df3725ce2.jpg> (дата обращения: 05.07.2021)



Рисунок 5 – Система для выделения нуклеиновых кислот «HK Chemagic MSM I Instrument»¹

¹ PerkinElmer URL: <https://chemagen.com/wp-content/uploads/2018/10/chemagic-MSM-I-content01-650x420.jpg> (дата обращения: 05.07.2020)

кислот; примечательно, что разные приборы используют различные методические подходы. Так, в установке «QIACube», представленной на рисунке 2, применяются специализированные колонки с сорбирующей мембраной на основе кремния. Лизирование образцов осу-

ществляется химическим методом. Производительность станции составляет до 12 образцов, продолжительность обработки – 45–60 минут в зависимости от протокола⁵.

Другой подход – использование магнитных частиц – применяется в таких выпускаемых компанией автоматических станциях, как «EZ1 Advanced XL» (рисунок 3) и «QIASymphony» (рисунок 4).

Производительность «EZ1 Advanced XL» достигает 14 образцов в течение 20 мин. Система «QIASymphony» рассчитана на большее количество анализируемых проб – до 96 образцов, при этом разделение на 4 отдельных блока позволяет использовать различные протоколы выделения одновременно. Особенности модульной конструкции «QIASymphony» позволяют дооснастить систему блоком, обеспечивающим автоматическую передачу очищенных нуклеиновых кислот для анализа на совместимом амплификаторе. Оба прибора оснащены программным обеспечением с установленными протоколами выделения и используют предварительно заполненные герметичные картриджи с реагентами, что максимально снижает риски кросс-контаминации и ошибок оператора.

На использовании магнитных частиц основана работа и автоматизированной системы «Chemagic MSM I Instrument» производства «PerkinElmer» (рисунок 5).

Компания утверждает, что созданные по собственной технологии «M-PVA» микросферы, содержащие мелкие магнитные частицы в оболочке на основе поливинилового спирта, модифицированной аффинными группами, обладают значительно большей силой и специфичностью связывания с нуклеиновыми кислотами, чем аналогичные решения других производителей⁶.

Процесс выделения нуклеиновых кислот с использованием системы «Chemagic MSM I Instrument» достаточно стандартен и включает стадии, аналогичные таковым подобным установкам других производителей. На начальном этапе происходит химическое лизирование образцов, нуклеиновые кислоты сорбируются на магнитных частицах, которые, удерживаясь электромагнитом в пробирке, несколько раз отмываются от примесей, после чего выполняется элюция нуклеиновых кислот с сорбента.

В зависимости от варианта установленного диспенсера, производительность прибора может варьировать, достигая 96 одновременно анализируемых образцов. Время анализа, в

⁵ QIAGEN. URL: <http://www.qiagen.com/us/instruments-and-automation/nucleic-acid-purification/sample-preparation/qiacube-connec/#orderinginformation> (дата обращения: 5.07.2020).

⁶ PerkinElmer URL: <http://www.chemagen.com/products/automated-tools-for-nucleic-acid-isolation/chemagen-technology/> (дата обращения: 05.07.2020).



Рисунок 6 – Оборудование серии «GeneXpert»¹

¹ URL: https://www.cepheid.com/Site%20Images/Systems/product_GXsuite%20%282%29.png (дата обращения: 05.07.2020)

зависимости от объема обрабатываемых проб, составляет от 15 до 55 мин.

Описанные выше системы обеспечивают высокий уровень автоматизации процесса выделения нуклеиновых кислот из образцов различного происхождения. По своей эффективности, в частности, по степени очистки, такие установки примерно соответствуют традиционным ручным методам выделения, однако значительно упрощают работу персонала, исключают возможность случайных ошибок и кросс-контаминации [28, 29]. За исключением старшей модели системы «QIASymphony», эксплуатация такого оборудования предусматривает участие персонала для постановки ПЦР.

В то же время существует оборудование, изначально спроектированное для полного цикла исследований без привлечения оператора. К его числу, в частности, относятся выпускаемая американской компанией «Cepheid» приборы серии «GeneXpert», успешно применяемые в диагностике ряда инфекционных заболеваний (рисунок 6) [30, 31].

Для своей работы данная система использует одноразовые проприетарные картриджи, которые содержат все необходимые химические реагенты как для подготовки образцов проб, так и для постановки ПЦР. Конструкция картриджей позволяет исключить возможность как контаминации реагентов, так и случайного разбрызгивания содержимого в окружающую среду. Лизис осуществляется ультразвуковым методом. Реакционная смесь перемещается по камерам картриджа, в которых происходят очистка и концентрирование нуклеиновых кислот, с помощью системы микротрубочек и насосов. На завершающем этапе в реакционной камере выполняется ПЦР-РВ. Многоканальная оптика и система светофильтров обеспечивает возможность мультиплексирования. Производительность составляет от 30 минут до 2 часов в зависимости от анализируемой пробы.



Рисунок 7 – Станция «BioFire FilmArray» (8 блоков)¹

¹ URL: https://docs.biofiredx.com/wp-content/uploads/2016/03/FilmArray_8units_.png (дата обращения: 05.07.2020).

Интересные технические решения использованы компанией «bioMérieux» в ее станциях серии «BioFire FilmArray» (рисунок 7).

Вместо картриджей в данной системе используются специальные одноразовые пакеты, состоящие из листов полипропиленовой пленки сложной формы, соединенных друг с другом таким образом, что внутри пакета образуется система каналов и резервуаров для реагентов [32]. Общий вид такого пакета, а также функциональное предназначение его отдельных элементов представлено на рисунке 8.

Непосредственно перед использованием растворяют лиофилизированные реагенты, на-



Рисунок 8 – Общий вид и схема функционального предназначения отдельных элементов реакционного пакета «FilmArray» [40]

Таблица 1 – Характеристики выпускаемых автоматизированных систем выделения

Наименование прибора (фирма-производитель)	Метод выделения нуклеиновой кислоты	Объем анализируемых проб, мл	Количество одновременно обрабатываемых проб	Продолжительность одного цикла выделения, мин
«NucliSENS easyMag» («bioMérieux»)	Магнитные частицы	0,01-1	24	40-60
«MagNA Pure Systems» («Roche»)	Магнитные частицы	0,2-4	8, 32, 96	20-180
«Maxwell» («Promega»)	Магнитные частицы	0,05-0,3	16	30-45
«GenoXtract» («Hain Lifescience»)	Магнитные частицы	0,01-1	12, 96	40-120
«MagCore» («RBC Bioscience»)	Магнитные частицы	0,2-4	16	30-90
«InnuPure» («Analytik Jena»)	Магнитные частицы	До 2	16	40
«QIAcube» («Qiagen»)	Магнитные частицы	0,05-1	12	45-60
EZ1 advanced («Qiagen»)	Магнитные частицы	До 1	14	20
«QIASymphony» («Qiagen»)	Магнитные частицы	0,1-2	96	35-60
«QuickGene» («Kurabo», Япония)	Магнитные частицы	0,2	8	6-20
«KingFisher» («Thermo Scientific»)	Магнитные частицы	0,2-5	24, 96	40-120
«Chemagic MSM I Instrument» («PerkinElmer»)	Магнитные частицы	До 1	1, 2, 4, 8	60

ходящиеся отдельных ячейках пакета. Исследуемый образец смешивают со специальным денатурирующим буфером, после чего вводится в пакет через отдельный порт. Далее подготовленный пакет загружается в прибор, все последующие операции выполняются в автоматическом режиме.

Все перемещения реакционной смеси по каналам пакета осуществляется за счет воздействия на его гибкие стенки пневматических поршней, которые в определенном порядке оказывают давление на наружную поверхность резервуаров.

В первом резервуаре анализируемый образец подвергается механическому лизису с помощью керамических микрошариков. Далее лизат направляется в следующие резервуары, где происходит выделение нуклеиновых кислот сорбцией на магнитных частицах с последующей отмывкой от примесей, а также ее очистка. На заключительном этапе осуществляется постановка двухстадийной мультиплексной ПЦР-РВ [32].

Представленная система выгодно отличается своей компактностью, возможностью сократить трудоемкость процесса, позволяет исключить ошибки оператора, а благодаря герметичным реакционным пакетам удается значительно снизить риск заражения персонала и контаминации окружающей среды при работе с патогенным материалом.

Основные характеристики основных представленных на рынке систем для автоматизированного выделения нуклеиновых кислот, включая описанные, представлены в таблице 1.

Как видно из данных, представленных в таблице, характеристики большинства станций для выделения нуклеиновых кислот близки друг к другу, многие используют метод сепарации на магнитных частицах как один из наиболее простых и эффективных. Это подтверждается и имеющимся опытом применения содержащих магнитные частицы наборов для выделения нуклеиновых кислот, как в стационарных лабораториях, так и в полевых условиях, в частности, при эксплуатации многофункционального мобильного модульного комплекса «Сыч».

В то же время, для максимально полной реализации всех возможностей современных молекулярно-генетических методов идентификации патогенных микроорганизмов, по нашему мнению, целесообразно внедрение в практику использование автоматизированных рабочих станций. Это позволит сократить время исследований при сохранении основных аналитических показателей, а также значительно снизить риски поражения персонала и контаминации окружающей среды. Перспективными являются направления миниатюризации используемого оборудования, разработки полевых пор-

тативных автоматических станций выделения нуклеиновых кислот, а также интеграции про-

цесса подготовки проб и их анализа методом ПЦР в одном устройстве.

Благодарности

Авторы выражают свою признательность Владимиру Ефимовичу Курочкину, директору федерального государственного бюджетного учреждения «Институт аналитического приборостроения» Российской Академии наук (ИАП РАН), доктору технических наук, профессору, за предоставленные обзорные материалы в области современных методов и приборов, предназначенных для выделения, очистки и концентрирования нуклеиновых кислот.

Вклад авторов/ Autor Contribution

Все авторы внесли свой вклад в концепцию рукописи, участвовали в обсуждении и написании этой рукописи, одобрили окончательную версию. Все авторы прочитали и согласились с опубликованной версией рукописи / All authors contributed to the conception of the manuscript, the discussion, and writing of this manuscript, approved the final version. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Информация о конфликте интересов

Авторы заявляют, что исследования проводились при отсутствии любых коммерческих или финансовых отношений, которые могли бы быть истолкованы как потенциальный конфликт интересов.

Сведения о рецензировании

Статья прошла открытое рецензирование двумя рецензентами, специалистами в данной области. Рецензии находятся в редакции журнала и в РИНЦе.

Список источников

1. Bloomfield M., Balm M., Blackmore T. Molecular testing for viral and bacterial enteric pathogens: gold standard for viruses, but don't let culture go just yet? // *Pathology*. 2015. V. 47. P. 227-233. <https://doi.org/10.1097/PAT.0000000000000233>
2. Abayasekara L., Perera J., Chandrasekharan V. et al. Detection of bacterial pathogens from clinical specimens using conventional microbial culture and 16S metagenomics: a comparative study // *BMC Infect. Dis.* 2017. V. 17. P. 631. <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2727-8>
3. Murphy J., Bustin S. Reliability of real-time reverse-transcription PCR in clinical diagnostics: gold standard or substandard? // *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2009. V. 9. P. 187-197. <https://doi.org/10.1586/14737159.9.2.187>
4. Кибирев Я.А., Бурлачук С.Е., Грудцына А.С. и др. Методы идентификации возбудителей опасных и особо опасных инфекционных заболеваний, основанные на анализе нуклеиновых кислот // *Вестник войск РХБ защиты*. 2018. Т. 2. № 4. С. 22-35.
5. Kibirev Ya.A., Burlachuk S.E., Grudcina A.S. et al. Methods for identification of causative agents of dangerous and particularly dangerous infections based on the analysis of nucleic acids // *Journal of NBC Protection Corps*. 2018. V. 2 № 4. P. 22-35. (in Russian).
6. Demeke T., Jenkins R. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits // *Anal. Bioanal. Chem.* 2010. V. 396. P. 1977-1990. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3150-9>
7. Maja Sidstedt M., Rådström P., Hedman J. PCR inhibition in qPCR, dPCR and MPS—mechanisms and solutions // *Anal. Bioanal. Chem.* 2020. V. 412. P. 2009-2023. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02490-2>
8. Шапхаев Э.Г., Цыренов В.Ж., Чебунина Е.И. Основы биотехнологии. Издательство ВСГТУ. 2005. 94 с.
9. Shaphaev A.G., Tsirenov V., Chebuniba E.I. *Fundamentals of Biotechnology*. Publishing office VSGTU. 2005. 94 pp. (in Russian).
10. Wink M. *An introduction to molecular biotechnology: molecular fundamentals, methods and application in modern biotechnology*. Wiley-VCH. Weinheim. Germany. 2006.
11. Ali N., de Rampazzo R., Costa A. et al. Current nucleic acid extraction methods and their implications to point-of-care diagnostics // *BioMed Res. Int.* 2017. V. 2017. 9306564. <https://doi.org/10.1155/2017/9306564>
12. Hedman J., Rådström P. Overcoming inhibition in realtime diagnostic PCR // *Meth. Mol. Biol.* 2013. V. 943. P. 17-48. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-353-4_2
13. Sidstedt M., Hedman J., Romsos E.L. et al. Inhibition mechanisms of hemoglobin, immunoglobulin G, and whole blood in digital and real-time PCR // *Anal. Bioanal. Chem.* 2018. V. 410. P. 2569-2583. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-0931-z>
14. Wilson I. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification // *Appl. Environ. Microbiol.* 1997. V. 63. P. 3741-3751.
15. Rådström P., Knutsson R., Wolffs P., et al. Pre-PCR processing: Strategies to generate PCR-compatible

samples // Mol. Biotechnol. 2004. V. 26. P. 133–146. <https://doi.org/10.1385/MB:26:2:13>

14. Антонова О.С., Корнева Н.А., Белов Ю.В. и др. Эффективные методы выделения нуклеиновых кислот для проведения анализов в молекулярной биологии (Обзор) // Научное Приборостроение. 2010. Т. 20. № 1. С. 3–9.

Antonova O.S., Korneva N.A., Belov Yu.V. et al. Methods of nucleic acids purification and separation in molecular biology (Review) // Nauchnoe Priborostroenie. 2010. V. 20. P. 3–9. (in Russian).

15. Eslami G., Khalatbari-Limaki S., Ehrampoush M.H. et al. Comparison of three different DNA extraction methods for *Linguatula serrata* as a food born pathogen // Iranian J. Parasitol. 2017. V. 12. P. 236–242.

16. Tan S.C., Yiap B.C. DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present // J. Biomed. Biotechnol. 2009. V. 2009. 574398. <https://doi.org/10.1155/2009/574398>.

17. Oskam C.L., Haile J., McLay E. et al. Fossil avian eggshell preserves ancient DNA // Proc. R. Soc. B. 2010. V. 277. P. 1991–2000. <http://doi.org/10.1098/rspb.2009.2019>

18. Грачев М.А., Кузнецова С.Ю., Щербакова Т.А. Метод выделения высокоочищенной ДНК для использования в полимеразной цепной реакции // Молекулярная биология. 2006. Т. 40. № 1. С. 180–183.

Grachev M.A., Kuznetsova S.Yu., Sherbakova T.A. A method for the isolation of pure DNA for PCR // Molecular Biology. 2006. V. 40. P. 159–161. (in Russian).

19. Zähringer H. Don't lose the thread. Product survey: Manual DNA extraction kits // Lab Times. 2012. V. 6, P. 52–56. URL: <https://docplayer.net/53735876-Pure-dnadevoid-of-impurities-from.htm>.

20. Doeblner R.W., Erwin B., Hickerson A. et al. Continuous-flow, rapid lysis devices for biodefense nucleic acid diagnostic systems // JALA. 2009. V. 14. P. 119–125. <https://doi.org/10.1016/j.jala.2009.02.010>

2.1 Chacon-Cortes D., Griffiths L. Methods for extracting genomic DNA from whole blood samples: current perspectives // J. Biorepository Science for Applied Medicine, 2014. V. 2. P. 1–9. <https://doi.org/10.2147/BSAM.S46573>

22. Archer M. J., Lin B., Wang Z. et al. Magnetic bead-based solid phase for selective extraction of genomic DNA // Anal. Biochem. 2006. V. 355. P. 285–297.

<https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.05.005>

23. Thatcher S.A. DNA/RNA preparation for molecular detection // Clin. Chem. 2015. V. 61. P. 89–99. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2014.221374>

24. Berensmeier S. Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2006. V. 73. P. 495–504. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0675-0>

25. Phillips K., McCallum N., Welch L. A comparison of methods for forensic DNA extraction: Chelex-100® and the QIAGEN DNA Investigator Kit // Forensic Sci. Int. Genet. 2012. V. 6. P. 282–285. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2011.04.018>

26. Schrader C., Schielke A., Ellerbroek L. et al. PCR inhibitors—occurrence, properties and removal // J. App. Microb. 2012. V. 113. P. 1014–1026. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x>

27. de Boer R, Peters R, Gierveld S. et al. Improved detection of microbial DNA after bead-beating before DNA isolation // J. Microbiol. Methods. 2010. V. 80. P. 209–211. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.11.009>

28. Verheijen J., Kaiser R., Bozic M. et al. Extraction of viral nucleic acids: comparison of 5 automated nucleic acid extraction platforms // J. Clin. Virol. 2012. V. 54. P. 255–259. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2012.03.008>

29. Shipley M., Koehler J., Kulesh D. et al. Comparison of nucleic acid extraction platforms for detection of select biothreat agents for use in clinical resource limited settings // J. Microbiol. Methods. 2012. V. 91. P. 179–183. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.06.008>

30. Mauk M., Liu C., Sadik M. et al. Microfluidic devices for nucleic acid (NA) isolation, isothermal NA amplification, and real-time detection // Methods Mol. Biol. 2015. V. 1256. P. 15–40. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2172-0_2

31. Saeed M., Ahmad M., Iram S. et al. GeneXpert technology. A breakthrough for the diagnosis of tuberculous pericarditis and pleuritis in less than 2 hours // Saudi Med. J. 2017. V. 38. No. 7. P. 699–705. <https://doi.org/10.15537/smj.2017.7.17694>

32. Poritz M., Blaschke A., Byington C. et al. FilmArray, an automated nested multiplex PCR system for multi-pathogen detection: development and application to respiratory tract infection // PLoS One. 2011. V. 6. e26047. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026047>

Об авторах

Филиал федерального государственного бюджетного учреждения «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации (г. Киров), 610000, Российская Федерация, г. Киров, Октябрьский проспект, д. 119.

Тихвинский Михаил Сергеевич. Начальник группы научно-исследовательского отдела, канд. биол. наук.
Воробьев Алексей Анатольевич. Ведущий научный сотрудник научно-исследовательского отдела, д-р биол. наук.

Кибирев Ярослав Александрович. Начальник научно-исследовательского отдела, канд. биол. наук.

Усенко Геннадий Сергеевич. Старший научный сотрудник научно-исследовательского отдела.

Козлов Артем Игоревич. Младший научный сотрудник научно-исследовательского отдела, канд. биол. наук.

Исупов Сергей Геннадьевич. Заместитель начальника научно-исследовательского отдела – начальник группы, канд. мед. наук.

Контактная информация для всех авторов: 23527@mil.ru
Контактное лицо: Тихвинский Михаил Сергеевич; 23527@mil.ru

Current State of Method Development for PCR Sample Preparations

M.S. Tikhvinskiy, A.A. Vorobiov, Ya.A. Kibirev,
G.S. Usenko, A.I. Kozlov, S.G. Isupov

Branch Office of the Federal State Budgetary Establishment «48 Central Scientific Research Institute» of the Ministry of Defence of the Russian Federation (Kirov), Oktyabrsky Avenue 119, Kirov 610000, Russian Federation

Received 3 August 2021. Accepted 23 September 2021.

The sensitivity, specificity and reproducibility of molecular genetic methods of analysis largely depend on the quality of the preliminary preparation of the analyzed samples. During the sample preparation, the tasks of disinfecting pathogenic material, lysing cell membranes, removing compounds and impurities that inhibit the polymerase chain reaction (PCR), as well as concentrating nucleic acids are solved. *The purpose of this work* is to select modern approaches to sample preparation for the PCR. Among the variety of different methods of sample preparation, the most widespread are the methods based on chemical lysis of cell membranes using chaotropic compounds, followed by purification of nucleic acids by solid-phase extraction using magnetic particles. This approach is implemented both in commercial kits for manual sample preparation and in various automated systems for the isolation of nucleic acids. The analysis of commercially available stations for the isolation of nucleic acids shows that their technical characteristics are similar: the duration of one isolation cycle is 40–90 minutes; the volume of the analyzed samples is from 0.1 to 2.0 ml; the number of simultaneously processed samples max – 96, min – 8. The method of the nucleic acid isolation is the magnetic particles. The main differences are in the type of analyzed samples, and technologies for lysis of the test material and DNA extraction. Our experience in the use of magnetic particle kits for the isolation of nucleic acids, both in stationary and in field laboratories confirms the effectiveness and reliability of this technology. Further development and improvement of the hardware for such work will, obviously, be aimed at miniaturizing the equipment, developing field portable automatic nucleic acid extraction stations, as well as integrating the process of sample preparation and analysis by PCR in one device.

Keywords: automated systems; identification; lysis; nucleic acids; pathogens; sample preparation; polymerase chain reaction; extraction.

For citation: Tihvinskiy M.S., Vorobiov A.A., Kibirev Ya.A., Usenko G.S., Kozlov A.I., Isupov S.G. Current State of Method Development for PCR Sample Preparations // Journal of NBC Protection Corps. 2021. V. 5. № 3. P. 236–246. <https://doi.org/10.35825/2587-5728-2021-5-3-236-246>

Acknowledgements

The authors would like to express their gratitude to Vladimir Eufimovich Kurochkin, Director of the Federal State Budget Institution – Institute for Analytical Instrumentation of the Russian Academy of Sciences (IAI RAS), Professor, Doctor of Technical Sciences, for providing materials on the methods and devices for PCR sample preparations.

Conflict of interest statement

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationship that could be construed as a potential conflict of interest.

Peer review information

The article has been peer reviewed by two experts in the respective field. Peer reviews are available from the Editorial Board.

References

See P. 243–244.

Authors

Branch Office of the Federal State Budgetary Establishment «48 Central Scientific Research Institute» of the Ministry of Defence of the Russian Federation (Kirov), Oktyabrsky Avenue 119, Kirov 610000, Russian Federation.

Mikhail Sergeevich Tikhvinskiy. Chief Group of the Scientific and Research Department. Candidate of Biological Sciences.

Aleksey Anatolievich Vorobiov. Leading Researcher of the Scientific and Research Department. Doctor of Biological Sciences.

Yaroslav Aleksandrovich Kibirev. Chief of the Scientific and Research Department. Candidate of Biological Sciences.

Gennadii Sergeevich Usenko. Senior Researcher of the Scientific and Research Department.

Artem Igorevich Kozlov. Junior researcher of the Scientific and Research Department. Candidate of Biological Sciences.

Sergey Gennadevich Isupov. Deputy Chief of the Scientific and Research Department. Candidate of Medical Sciences.

Contact information for all authors: 23527@mil.ru

Contact person: Mikhail Sergeevich Tikhvinskiy; 23527@mil.ru