

УДК 575

DOI: <https://doi.org/10.17816/brmma75680>



ПОДХОДЫ К ВЫДЕЛЕНИЮ И ОЧИСТКЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ИЗ КРОВИ ДЛЯ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ЛЕЙКОЦИТАРНОГО АНТИГЕНА

О.А. Баранов, Д.А. Байран, И.В. Маркин, Е.С. Щелканова, Е.А. Журбин

Военный инновационный технополис «ЭРА», Анапа, Россия

Резюме. Гистосовместимость донора и реципиента обусловлена наличием на мембране клеток главного белкового комплекса гистосовместимости и является ключевым условием успешной трансплантации клеток, тканей и органов. Для определения гистосовместимости проводят генотипирование человеческого лейкоцитарного антигена, точность которого значительно зависит от качества и количества полученных из биоматериала нуклеиновых кислот. В лабораторной практике наиболее чистую и интактную дезоксирибонуклеиновую и рибонуклеиновую кислоты извлекают из крови, однако выбор доступной, эффективной и в то же время экономически оправданной методики их получения по-прежнему остается трудной задачей. Рассмотрены методики выделения и очистки нуклеиновых кислот из крови: органическая экстракция, высаливание, с помощью спин-колонок и магнитных частиц («бидов»), сопоставлены преимущества и недостатки, показатели их эффективности, практичности и стоимости. Обоснован выбор периферической крови в качестве источника генетического материала для генотипирования человеческого лейкоцитарного антигена. Проанализированы экспериментальные данные, сравнивающие соотношение «цена — качество» коммерческих протоколов извлечения дезоксирибонуклеиновой и рибонуклеиновой кислот из крови. Оценены перспективы модификации методик выделения и очистки нуклеиновых кислот из биоматериала для секвенирования генов человеческого лейкоцитарного антигена I и II классов с целью повышения эффективности оказания высокотехнологичной помощи. В целом потребность в доступных, недорогих и эффективных протоколах извлечения дезоксирибонуклеиновой и рибонуклеиновой кислот из минимальных объемов биоматериала стимулирует оптимизацию и модификацию уже существующих протоколов и создание новых методик на новых физико-химических принципах.

Ключевые слова: генотипирование; человеческий лейкоцитарный антиген; нуклеиновые кислоты; выделение геномной дезоксирибонуклеиновой кислоты; выделение рибонуклеиновой кислоты; фенол-хлороформная экстракция; высаливание; спин-колонки; магнитные частицы.

Как цитировать:

Баранов О.А., Байран Д.А., Маркин И.В., Щелканова Е.С., Журбин Е.А. Подходы к выделению и очистке нуклеиновых кислот из крови для генотипирования человеческого лейкоцитарного антигена // Вестник Российской военно-медицинской академии. 2022. Т. 24, № 1. С. 111–124. DOI: <https://doi.org/10.17816/brmma75680>

DOI: <https://doi.org/10.17816/brmma75680>

APPROACHES TO ISOLATING AND PURIFYING NUCLEIC ACIDS FROM BLOOD FOR GENOTYPING HUMAN LEUKOCYTIC ANTIGEN

O.A. Baranov, D.A. Bairan, I.V. Markin, E.S. Shchelkanova, E.A. Zhurbin

"ERA" Military Innovation Technopolis, Anapa, Russia

ABSTRACT: Donor–recipient histocompatibility results from the presence on cell membranes of the main protein complex of histocompatibility and is a key condition for successful transplantation of cells, tissues, and organs. To determine histocompatibility, human leukocyte antigen is genotyped, and its accuracy relied significantly on the quality and quantity of nucleic acids obtained from the biomaterial. In laboratory practice, the most pure and intact deoxyribonucleic and ribonucleic acids are extracted from the blood; however, the choice of an accessible, effective, time-efficient, and viable method for their production remains challenging. The methods of isolation and purification of nucleic acids from the blood include organic extraction, salting out, and use of spin columns and magnetic particles ("bidids"), and their advantages and disadvantages, efficiency indicators, practicality, and cost were compared. The selection of the peripheral blood as a source of genetic material for genotyping human leukocyte antigen is justified. Experimental data comparing the price–quality ratio of commercial protocols for the extraction of deoxyribonucleic and ribonucleic acids from blood were analyzed. Prospects of modification of procedures for isolation and purification of nucleic acids from biomaterial for sequencing of genes of human leukocyte antigen classes I and II to increase efficiency of high-tech care are evaluated. Generally, the need for affordable and effective protocols for the extraction of deoxyribonucleic and ribonucleic acids from minimal biomaterial volumes stimulates the optimization and modification of existing protocols and the creation of new methods on new physicochemical principles.

Keywords: genotyping; human leukocyte antigen; nucleic acids; isolation of genomic deoxyribonucleic acid; isolation of ribonucleic acid; phenol-chloroform extraction; salting out; spin columns; magnetic particles.

To cite this article:

Baranov OA, Bairan DA, Markin IV, Shchelkanova ES, Zhurbin EA. Approaches to isolating and purifying nucleic acids from blood for genotyping human leukocytic antigen. *Bulletin of the Russian Military Medical Academy*. 2022;24(1):111–124. DOI: <https://doi.org/10.17816/brmma75680>

Received: 27.01.2022

Accepted: 15.02.2022

Published: 25.03.2022

ВВЕДЕНИЕ

Актуальным вопросом в области иммуногенетики и трансплантологии остается модификация алгоритмов типирования человеческого лейкоцитарного антигена (HLA) (от *англ.* Human Leukocyte Antigens) для повышения точности результатов скрининга гистосовместимости и обеспечения эффективного подбора пар «донор — реципиент». Несовпадение HLA-статуса донора и реципиента приводит к иммунному ответу и отторжению трансплантата — реакциям «хозяин против трансплантата» (РХПТ) и «трансплантат против хозяина» (РТПХ), поэтому при аллотрансплантации клеток, тканей, органов критически важна гистосовместимость донора и реципиента [1]. За тканевую совместимость отвечают высокополиморфные гены главного комплекса гистосовместимости (ГКГ) (*major histocompatibility complex* — МНС), кодирующие специфические белки, которые презентруют антигены на поверхности мембран клеток лимфоцитам для распознавания и уничтожения собственных измененных и чужеродных клеток (у человека семейство генов МНС именуется как HLA).

Молекулярные методы анализа нуклеиновых кислот широко используются как в фундаментальных, так и в прикладных исследованиях. Одним из основных молекулярно-генетических методов анализа является генотипирование — выявление присутствующих в геномной последовательности организма генетических вариаций (полиморфизмов) посредством сравнения его генотипа с референтным геномом. Генотипирование нашло практическое применение в идентификации микроорганизмов, пренатальной диагностике, персонализированной медицине, при переливании крови, а также в трансплантологии [2–5]. Для эффективного подбора потенциального донора трансплантата проводят предтрансплантационный генетический скрининг — HLA-генотипирование [6, 7].

Высокое качество и достаточное количество нуклеиновых кислот — ключевые условия успешного проведения высокоточных молекулярно-биологических исследований. Однако научная и клиническая практика, как правило, требует значительных материальных и финансовых вложений, что вынуждает сотрудников подбирать метод получения нуклеиновых кислот, руководствуясь не только его эффективностью, но также время- и трудозатратностью, экономичностью и потребностью в дополнительном оборудовании и реагентах. Остается актуальной проблема разработки новых и оптимизации, модификации уже существующих методов выделения и очистки нуклеиновых кислот, адаптированных под конкретные задачи и возможности лабораторий.

Цель исследования — описать принцип действия наиболее распространенных методик получения нуклеиновых кислот из периферической крови, сравнить характеристики относительно друг друга исходя из практического и экономического критериев для установления

оптимального протокола выделения и очистки дезоксирибонуклеиновой (ДНК) и рибонуклеиновой кислот (РНК) для HLA-генотипирования и дать рекомендации исследователям по выбору наиболее эффективных методик и протоколов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выделение и очистка нуклеиновых кислот осуществляется на основе физико-химических методик, позволяющих отделить ДНК и РНК от балластных биомолекул и клеточного дебриса [8]. Первый этап любого протокола выделения заключается в механическом, химическом или ферментативном лизисе биоматериала, целью которого является максимально полное извлечение нуклеиновых кислот из образцов [9]. Высокая степень очистки нуклеиновых кислот обеспечивает их стабильность в течение продолжительного времени, поэтому полученный необработанный лизат необходимо подвергнуть физико-химической и ферментативной очистке от клеточных компонентов и химических соединений, препятствующих длительному хранению нуклеиновых кислот и их дальнейшему использованию в молекулярно-биологических исследованиях: рестрикционном анализе, ПЦР, молекулярном клонировании, секвенировании и т. д. Методики очистки нуклеиновых кислот подразделяют на жидкофазные (органическая экстракция и высаливание) и твердофазные (на спин-колонках и магнитных частицах) [10–12].

Качественный и количественный анализы препарата нуклеиновой кислоты осуществляются широко распространенными и хорошо зарекомендовавшими себя методами спектрофотометрии (Nano Drop, Nano Photometer P-Class), флуориметрии (Qubit, Quantus™ Fluorometer) и гель-электрофореза. Спектрофотометрически концентрацию нуклеиновой кислоты определяют по величине поглощенного излучения определенной длины волны (пик абсорбции ~ 260 нм, A260), а качество — по отношению A260/A280, которое при значении < 1,8 для ДНК и < 2 для РНК указывает на недостаточную степень очистки от белков [8]. Флуориметрическая методика основана на специфическом связывании нуклеиновой кислоты с флуоресцентным зондом и флуоресценции образованного комплекса, интенсивность свечения которого пропорциональна концентрации нуклеиновой кислоты [13, 14].

Методика органической экстракции основана на фазовом разделении раствора нуклеиновых кислот и фенол-хлороформной смеси. При классической фенол-хлороформной очистке геномной ДНК к лизату клеток добавляют смесь фенола и хлороформа, затем центрифугируют для разделения двух фаз (рис. 1, а). После расслаивания нуклеиновые кислоты распределяются в верхней водной фазе; липиды, углеводы и клеточный дебрис попадают в более плотную органическую фазу, денатурированные белки — в интерфазу. Водную фазу аккуратно отбирают, повторяют процедуру при более низком pH

(4–6) и отбирают органическую фазу. ДНК из полученного экстракта осаждают этанолом и растворяют в буфере TE или деионизированной воде (mQ) [15, 16].

Для предотвращения пенообразования и улучшения разделения водной и органической фаз в фенол-хлороформную смесь добавляют изоамиловый спирт до объемного соотношения 25 : 24 : 1 соответственно, что способствует повышению эффективности очистки нуклеиновых кислот. Существуют готовые наборы реагентов — так называемые «киты» для органической экстракции, гидролизующие РНК и позволяющие избирательно выделять и очищать ДНК из клеточного лизата [17].

Методика органической экстракции РНК аналогична экстракции геномной ДНК (см. рис. 1, *b*). Биоматериал лизируют в феноле или тризоле (TRIzol Reagent), поддерживающих целостность РНК, добавляют хлороформ и разделяют фазы центрифугированием [18, 19]. Верхнюю водную фазу отбирают и повторяют процедуру при необходимости получить особо чистый препарат РНК. На финальной стадии РНК осаждают из водной фазы изопропанолом и растворяют в mQ [18–20].

Основными преимуществами классической фенол-хлороформной методики экстракции нуклеиновых кислот и ее модификаций являются относительно низкая стоимость, пригодность для основных типов биоматериала (кровь, моча, волосы, слюна и букальный эпителий, ткани) и эффективность лизиса клеток. Несмотря на трудоемкость процесса очистки, варьированность выхода нуклеиновых кислот и токсичность используемых реагентов, органическая экстракция не потеряла своей актуальности, удобна при получении нуклеиновых кислот из сложных гетерогенных образцов и служит ориентиром при оценке эффективности новых методик.

Выделение и очистка геномной ДНК способом высаливания основана на ее экстракции из клеточного лизата и преципитации белков под действием осаждающих реагентов или высокой концентрации солей [21, 22]. Методика применяется для получения геномной ДНК из растительных и животных клеток и особенно часто из клеток цельной крови (рис. 2) [21–24].

Современные методики выделения и очистки геномной ДНК из клеток крови состоят из трех последовательных стадий: 1) лизис безъядерных клеток (эритроцитов), центрифугирование и удаление супернатанта, содержащего клеточный дебрис; 2) лизис ядерных клеток (лейкоцитов), осаждение белков и высвобождение ДНК насыщенным раствором NaCl в водную фазу, которую переносят в новую пробирку; и 3) осаждение ДНК из водной фазы этанолом или изопропанолом, очистка от примесей и растворение полученной ДНК в TE-буфере или mQ [23]. Альтернативный протокол содержит незначительные отличия, такие как предварительная промывка цельной крови от плазмы, термический лизис лейкоцитов и осаждение белков не только насыщенным раствором NaCl, но и хлороформом [24].

Методики высаливания привлекают внимание исследователей благодаря простоте исполнения, низкой стоимости реагентов и отсутствию потребности в дополнительном оборудовании, а полученная ДНК пригодна для ПЦР, клонирования, рестрикционного анализа и саузерн-блоттинга.

В основе колоночной методики очистки нуклеиновых кислот лежит высокая аффинность их отрицательно заряженного остова к положительно заряженным частицам мембраны. В условиях высокой ионной силы и наличия хаотропных солей (тиоцианата гуанидина) нуклеиновые кислоты избирательно связываются с мембраной и элюируются при низкой ионной силе раствора. Тиоцианат гуанидина дестабилизирует водородные связи, ван-дер-ваальсовы и гидрофобные взаимодействия, облегчает иммобилизацию нуклеиновых кислот на носителе и инактивирует нуклеазы. В качестве материала для мембраны используют силикатные носители (силикагель, силику), стеклянные частицы, диатомит и анионообменные носители. Пропускание клеточного экстракта через спин-колодку, промывку и элюирование нуклеиновых кислот проводят в центрифуге или посредством подключения к вакуумному насосу [25–27].

При выделении и очистке геномной ДНК на спин-колонках клетки лизируют в буфере, содержащем додецилсульфат натрия (SDS), протеиназу К (для удаления белковых примесей и инактивации нуклеаз) и РНКазу А (для очистки от РНК). Полученный экстракт пропускают через колонку, и геномная ДНК связывается фильтрующей мембраной, которую затем промывают от остаточных белков и солей, далее ДНК элюируют с поверхности мембраны (рис. 3 *a*). Геномная ДНК, полученная с помощью спин-колонок, отличается хорошим качеством и отсутствием ингибиторов ферментативных реакций и балластных примесей, что способствует получению воспроизводимых результатов анализов [26]. Колоночная методика выделения и очистки РНК в целом аналогична протоколу экстракции ДНК (рис. 3, *b*) и позволяет получать тотальную РНК — как мРНК, так и некодирующие РНК. Важным фактором является использование реагентов и колонок, не содержащих РНКаз [28].

Методика выделения и очистки нуклеиновых кислот на спин-колонках считается одной из лучших среди доступных вариантов и широко распространена благодаря своей универсальности, простоте выполнения и эффективности очистки от ингибиторов ферментативных реакций и примесей. Однако методика имеет существенные ограничения, связанные с высокой стоимостью анализа большого количества образцов и поэтому малоприменима для лабораторий с ограниченным бюджетом. В практическом плане возможности колоночной методики лимитированы пропускной способностью мембраны колонки, склонной к засорению пор вязкими образцами.

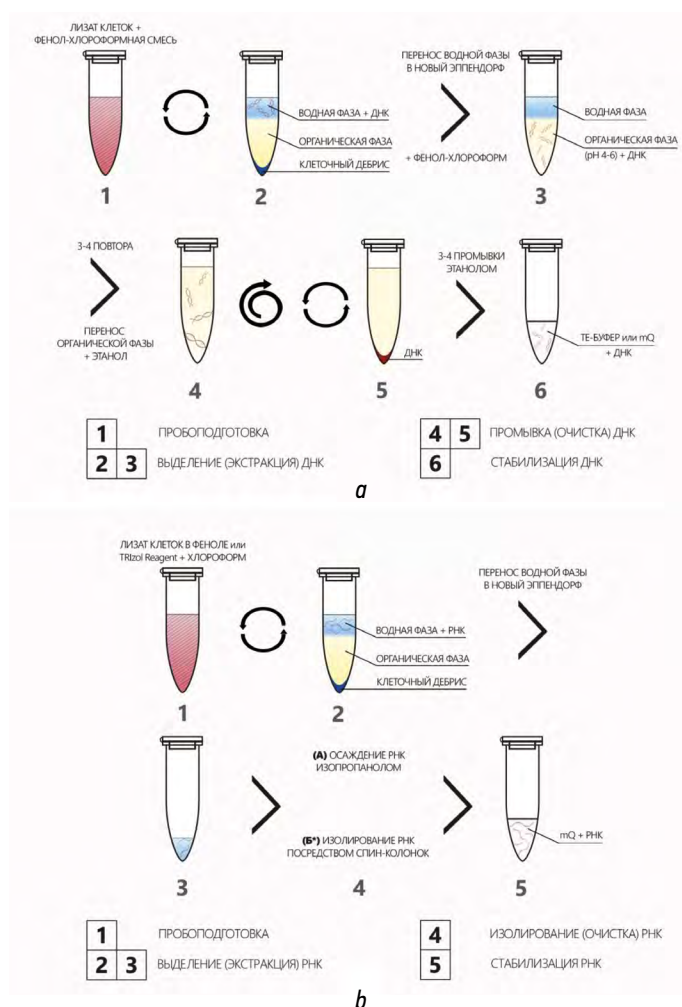


Рис. 1. Органическая (фенол-хлороформная) экстракция нуклеиновых кислот: *а* — геномной ДНК; *б* — РНК
Fig. 1. Organic (phenol-chloroform) extraction of nucleic acids: *a* — genomic deoxyribonucleic acid; *b* — ribonucleic acid

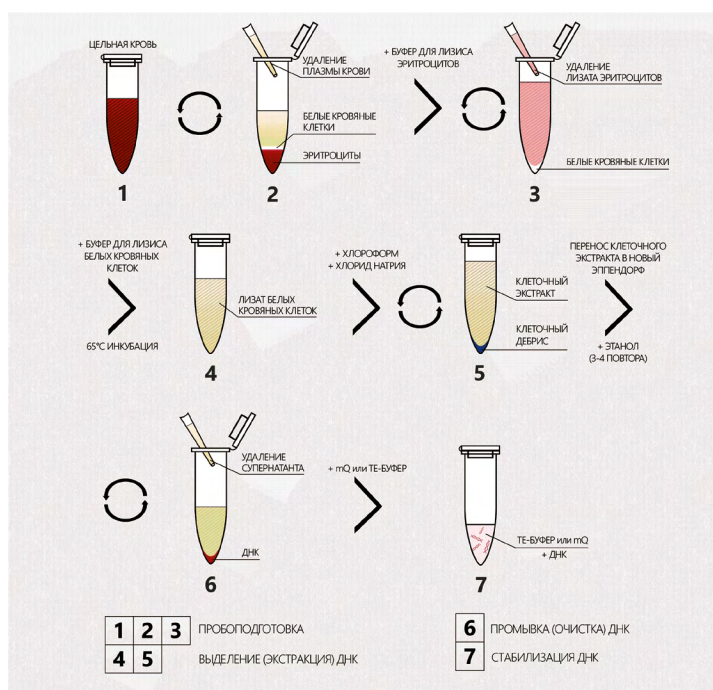


Рис. 2. Выделение геномной ДНК путем высаливания
Fig. 2. Isolation of genomic deoxyribonucleic acid by salting out

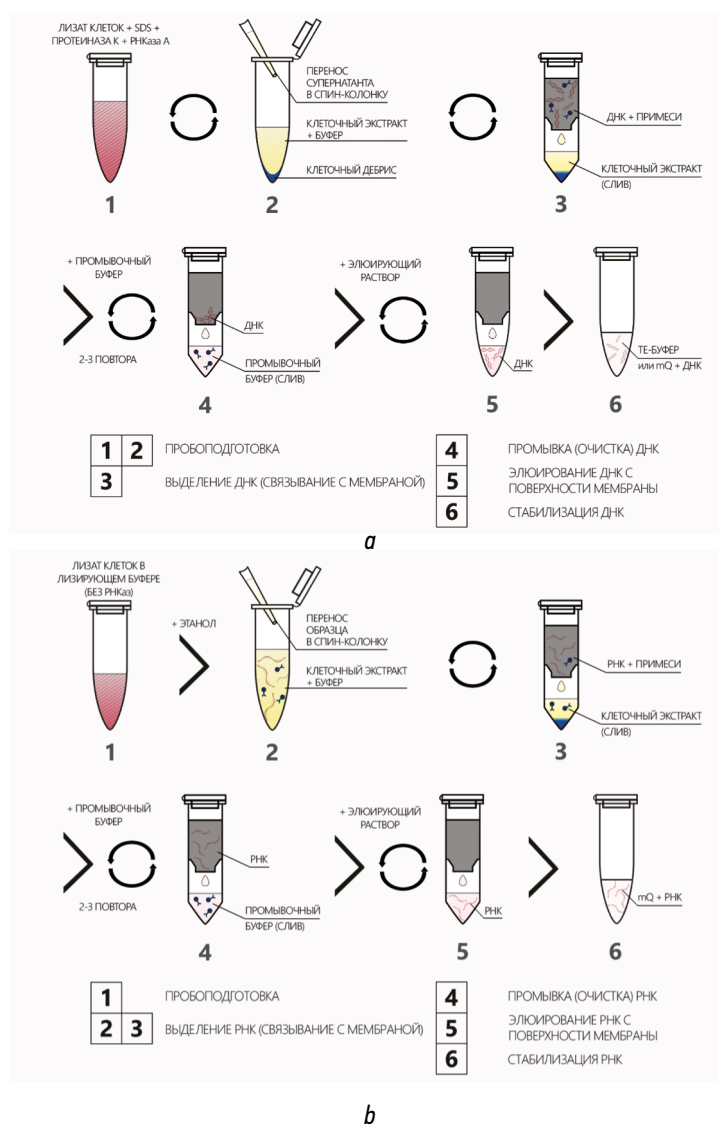


Рис. 3. Выделение нуклеиновых кислот с использованием спин-колонок: *а* — геномной ДНК; *б* — РНК
Fig. 3. Isolation of nucleic acids using spin columns: *a* — genomic deoxyribonucleic acid; *b* — ribonucleic acid

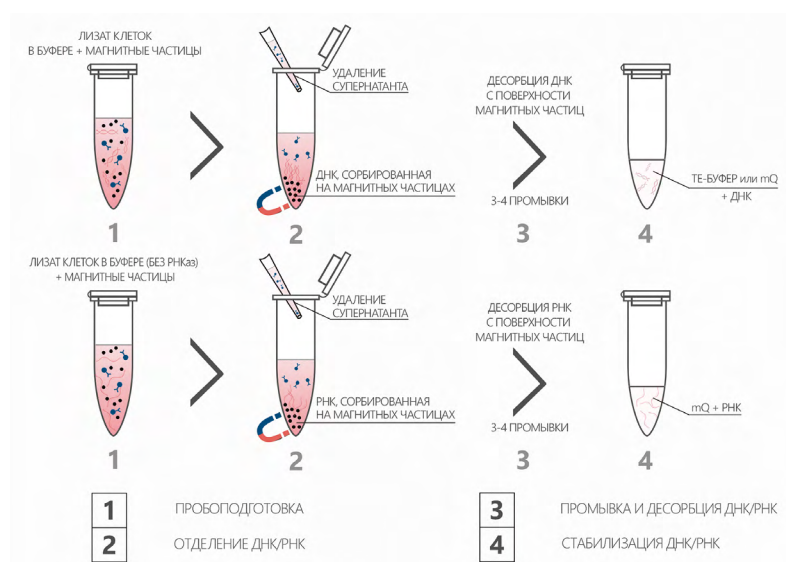


Рис. 4. Выделение нуклеиновых кислот на магнитных частицах: *а* — геномной ДНК; *б* — РНК
Fig. 4. Isolation of nucleic acids on magnetic particles: *a* — genomic deoxyribonucleic acid; *b* — ribonucleic acid

Принцип выделения и очистки нуклеиновых кислот на магнитных частицах («магнитных бидрах» — от *англ.* magnetic beads) заключается в обратимом связывании нуклеиновых кислот на поверхности магнитных частиц [29, 30]. Современные магнитные частицы покрывают разным материалом: пористым стеклом, диоксидом кремния, неорганическими магнитными материалами, полистиролом, целлюлозой [31].

Эффективность выделения и очистки нуклеиновых кислот на магнитных частицах повышают путем иммобилизации олигонуклеотидов, нуклеотидная последовательность которых комплементарна последовательности целевых нуклеиновых кислот, например, поли(Т)-олигонуклеотидов для селективного связывания мРНК [32, 33].

Клетки лизируют в буфере и вносят в пробирку магнитные частицы, сорбирующие нуклеиновые кислоты из клеточного экстракта. Пробирку ставят на магнитный штатив, который притягивает магнитные частицы к стенке. Удаление супернатанта и промывка позволяют быстро очистить притянутые магнитные частицы от несвязанных примесей, в том числе от нуклеиновых кислот, не содержащих целевую последовательность (рис. 4) [29, 30].

Наборы на основе магнитных частиц предназначены для быстрого и эффективного получения нуклеиновых кислот и удобны при одновременном выделении из большого количества образцов. Метод сочетает в себе высокий выход ДНК и РНК хорошего качества и воспроизводимость получаемых результатов.

К основным типам биоматериала человека, применимых для генетических исследований, относят периферическую кровь, слюну, буккальный эпителий, мочу и волосы. Несмотря на инвазивность процедуры забора периферической крови, а также необходимость наличия квалифицированного медицинского персонала для проведения процедуры, получаемые из нее нуклеиновые кислоты превосходят по качественным и количественным показателям нуклеиновые кислоты из другого биоматериала, что делает кровь главным источником геномной ДНК и РНК в диагностических и эпидемиологических исследованиях [34–36]. В современной практике генотипирование проводится с использованием следующих методик: полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (RFLP), случайно амплифицируемая полиморфная ДНК (RAPD), полиморфизм длин амплифицированных фрагментов ДНК (AFLPD), аллель-специфические олигонуклеотиды (ASO), секвенирование, ДНК-микрочипы. В зависимости от выбранной методики генотипирования для создания библиотек в качестве матрицы используют геномную ДНК или РНК. В геномных библиотеках, получаемых из геномной ДНК, заключена информация о полной нуклеотидной последовательности генома, что делает возможным выявление однонуклеотидных полиморфизмов интронных областей. Напротив, из РНК создают библиотеки кДНК, несущие в себе нуклеотидные последовательности экзонов.

Сравнение методик получения геномной ДНК. Лаборатории с недостаточным финансированием имеют ограниченные возможности использования дорогих коммерческих наборов для извлечения геномной ДНК из крови. Авторами работ [37–40] произведен поиск более дешевой альтернативы наборам со спин-колонками и сформулированы предложения по использованию имеющихся протоколов жидкофазных методик получения ДНК и разработке новых, чтобы снизить стоимость процедуры в пересчете на один образец при сохранении эффективности выделения и очистки ДНК.

Показано, что классическая фенол-хлороформная экстракция благодаря длительной обработке ядерных клеток крови (лейкоцитов) в лизирующем буфере с SDS и протеиназой К позволяет извлекать из крови геномную ДНК, пригодную для ПЦР-анализа [38]. Тем не менее, из-за вариабельного качества ДНК, полученной с помощью данной методики, она не может быть использована для создания ДНК-библиотек и генотипирования [39]. Исследователи отмечают непрактичность фенол-хлороформной экстракции в условиях проведения высокопроизводительных многоканальных и потоковых исследований, так как данная методика включает большое число сложных длительных процедур и манипуляций [38, 39].

В работе D. Chacon-Cortes et al. [37] обращено внимание на перспективы оптимизации протоколов выделения и очистки геномной ДНК способом высаливания и разработан менее дорогой и времязатратный протокол. В более поздних работах [40] указывается на то, что повышение эффективности очистки обеспечивается благодаря отделению безъядерных клеток крови (эритроцитов, тромбоцитов) от ядерных клеток (лейкоцитов) и лизису полученного осадка лейкоцитов при повышенной температуре в большем объеме лизирующего буфера и SDS [38, 39]. Разработанные протоколы позволяют извлекать качественную высокомолекулярную геномную ДНК и использовать ее для ПЦР [38, 40] и гибридизационного анализа на ДНК-микрочипах, таргетного секвенирования и секвенирования *de novo* [39].

Стандартные протоколы коммерческих наборов со спин-колонками («Nucleospin» («Macherey-Nagel», «Duren», Германия)) и наборов с магнитными частицами («ChargeSwitch gDNA Tissue Mini» («Invitrogen», США)), как показано в работе A. Psifidi et al. [41], не обеспечивают необходимого качества получаемой из крови геномной ДНК для проведения NGS секвенирования, создания и скрининга библиотек ДНК, вследствие чего отмечается острая необходимость в модификации стандартных протоколов, в том числе посредством введения дополнительных этапов пробоподготовки биоматериала и очистки ДНК. Кроме того, авторы предлагают 2 экспериментально подтвержденных решения данной проблемы: а) предварительное отделение ДНК-содержащих ядерных клеток (лейкоцитов) от белков плазмы крови и безъядерных

клеток (эритроцитов и тромбоцитов); б) повышение эффективности лизиса лейкоцитов за счет увеличения температуры инкубации (56 °C), ее длительности и использования больших объемов лизирующего буфера и протеиназы К. Предложенные меры позволяют улучшить качество и увеличить выход геномной ДНК, пригодной для длительного хранения и удовлетворяющей требованиям чувствительных молекулярных методик анализа [41]. Так, для проведения гибридационного анализа ДНК с использованием ДНК-микрочипов достаточно 2,5–3 мкг ДНК, для таргетного ресеквенирования ДНК — 3–6 мкг, для секвенирования *de novo* — 10–20 мкг [42]. Помимо эффективности разработанных протоколов, авторы оценили их стоимость и времязатратность, признав адекватным решение увеличить стоимость (с 3 до 4€ на один образец) и длительность процедуры получения ДНК для увеличения ее выхода и повышения качества [41].

Наибольшей эффективностью выделения и очистки геномной ДНК из малых объемов крови обладают коммерческие наборы, используемые в криминалистических лабораториях. Стандартные протоколы наборов со спин-колонками («DNA Investigator» («QIAGEN», США)) и магнитными частицами («PrepFiler® BTA» («Life Technologies™», США), «DNA IQ™» («Promega», США)) позволяют удалять ингибиторы ПЦР и создавать библиотеки ДНК для NGS-платформ «Ion S5™» и «MiSeq FGx™» [43]. Данные наборы не нашли повсеместного спроса из-за высокой себестоимости процедуры (от 6 до 10 \$ и дороже за 1 выделенный образец геномной ДНК).

В таблице 1 приведены экспериментальные данные об основных характеристиках геномной ДНК, которая была получена из крови путем органической экстракции, высаливания, на спин-колонках и магнитных частицах [37–41, 43].

Примечание: М. Metzker [42] указывает, что минимальная концентрация ДНК для проведения NGS секвенирования соответствует 50 нг/мкл; Х. Zeng et al. [43] не приводят данных о концентрации полученной геномной ДНК и соотношении A260/280, однако ее качество позволило провести STR-генотипирование и секвенирование на платформах «Ion S5™» и «MiSeq FGx™».

Для проведения HLA-генотипирования допустимо получать геномную ДНК из периферической крови не только коммерческими наборами со спин-колонками и магнитными частицами, но также недорогими протоколами высаливания. Заметим, что модифицированные лабораторные протоколы высаливания способны конкурировать по эффективности с готовыми «китами» [38–40], а доработка протокола со спин-колонками Nucleospin позволяет значительно улучшить выход и чистоту геномной ДНК [41].

Сравнение методик получения РНК. Лаборатории, занимающиеся разработкой и оптимизацией протоколов экстракции нуклеиновых кислот из крови, в случае с РНК отдают предпочтение коммерческим наборам со спин-колонками и магнитными частицами. В отличие от геномной

ДНК, получать которую допустимо с использованием более дешевых жидкофазных методик, РНК извлекается в ущерб экономической составляющей, чтобы компенсировать недостаток опыта персонала при сохранении качественных и количественных показателей препарата РНК [44–48]. Подобная тенденция возникает из-за высоких требований к качеству РНК и сложности работы с ней, что опосредовано химической нестабильностью и восприимчивостью к РНКазам. Широко распространенным инструментом оценки целостности (интактности) выделенной РНК является «Agilent 2100 Bioanalyzer». Значения RIN (RNA integrity number) ≥ 7 свидетельствуют об интактном состоянии РНК, тогда как при значениях < 7 наблюдается ее деградация, что приводит к искажению результатов анализа уровня экспрессии генов путем количественного ОТ-ПЦР и РНК-секвенирования (RNA-seq) [49, 50].

По данным D. Schwochow et al. [48], полученные с использованием набора «TRIzol LS reagent» образцы РНК демонстрировали большой разброс значений RIN, а в работе J. Kim et al. [46] — низкие значения A260/A280 ($\leq 1,7$) и завышенные значения концентрации, поскольку авторы не обрабатывали полученные образцы РНК ДНКазой, что привело к их контаминации геномной ДНК.

Наивысшие качественные и количественные показатели были установлены у РНК, извлеченной коммерческим набором с магнитными частицами «MagMAX» [45, 47], аналогичный набор «easyMAG» был признан наихудшим из анализируемых по причине низкого выхода РНК, обусловленного ее большими потерями из клеточной пеллеты в супернатант [44]. Ручной и автоматизированный протоколы «MagMAX» дали сравнимые результаты по выходу тотальной РНК, A260/A280, целостности РНК, выходу малых РНК и соотношению мРНК/микроРНК. Автоматизированный протокол более предпочтителен, поскольку отличается меньшими трудозатратами и исключает разброс качественных и количественных показателей из-за человеческого фактора [45, 47].

Методики выделения и очистки РНК на основе спин-колонок представлены несколькими коммерческими наборами — «Tempus», «Norgen», «Nucleospin», «RiboPure», «LeukoLOCK», «PAXgene», «RNeasy» и др. У РНК, полученной из крови наборами «Tempus» и «Norgen», путем количественной ОТ-ПЦР были установлены уровни целевых мРНК, сравнимые с лидирующим по характеристикам набором «MagMAX» [45, 47]. Выводы и рекомендации по использованию наборов со спин-колонками RNeasy и RiboPure противоречивы: в работе A. Rodríguez et al. [44] при использовании этих наборов с совместимыми буферами для лизиса была получена РНК с высоким выходом и значениями RIN, однако в работе D. Schwochow et al. [48] эти же протоколы оказались в числе худших по количественным показателям и целостности очищенной РНК.

В таблице 2 приведены основные характеристики РНК, которая была получена из крови с помощью органической экстракции, на спин-колонках и магнитных

частицах. Установлены функционально значимые особенности наиболее результативных протоколов: 1) использование расходных материалов, не содержащих РНКаз (RNase-free); 2) обработка полученной РНК ДНКазой; 3) отделение ретикулоцитов от лейкоцитов. При этом отделение лейкоцитов от остальных клеток крови признано целесообразным при получении геномной ДНК, в случае с РНК удаление ретикулоцитов оказывает позитивное влияние на качество РНК-препарата, а также облегчает

последующее секвенирование. Так, за счет отделения ретикулоцитов снижается количество прочтений («ридов») мРНК-транскриптов гемоглобина, что позволяет секвенировать более редкие транскрипты [48].

Для выделения и очистки РНК из крови мы рекомендуем использовать коммерческие наборы со спин-колонками «LeukoLOCK», «Nucleospin», «Tempus», «Norgen» и «PAXgene» и набор с магнитными частицами «MagMAX».

Таблица 1. Концентрация и чистота ДНК, полученной из крови разными методиками

Table 1. Concentration and purity of deoxyribonucleic acid obtained from blood by different methods

Протокол	Средние значения концентраций ДНК, нг/мкл	Средние значения A260/280
Органическая экстракция		
Фенол-хлороформная экстракция [38]	302	1,83
Фенол-хлороформная экстракция с добавлением изоамилового спирта [39]	68	1,71
Фенол-хлороформная экстракция [41]	260	1,67
Высаливание		
Традиционный протокол высаливания [37]	32	1,75
Модифицированный протокол высаливания [37]	40	1,75
Стандартный протокол высаливания [38]	21	1,93
Модифицированный протокол высаливания [38]	368	1,84
Модифицированный протокол высаливания [39]	347	1,73
Традиционный протокол высаливания [40]	86	1,77
Протокол двойного высаливания [40]	122	1,80
Выделение на спин-колонках		
Протокол со спин-колонками QIAamp DNA Blood Maxi Kit [37]	103	2,02
Протокол со спин-колонками Roche Diagnostics GmbH Kit [38]	24	1,86
Протокол со спин-колонками Origin Blood DNA Kit [39]	67	1,58
Протокол со спин-колонками QIAamp DNA Blood Mini Kit [40]	7	1,79
Стандартный протокол со спин-колонками Nucleospin [41]	55	1,76
Модифицированные протоколы со спин-колонками Nucleospin Blood, Tissue и Dx [41]	218–310	1,85–1,90
Протокол со спин-колонками DNA Investigator [43]	N/A	
Выделение на магнитных частицах		
Протокол с магнитными частицами Charge-Switch gDNA Tissue Mini kit [41]	7	1,47
Модифицированный протокол In-house с магнитными частицами PMSi-H1.0–5 [41]	207	1,85
Протокол с магнитными частицами PrepFiler BTA [43]	N/A	
Протокол с магнитными частицами DNA IQ [43]	N/A	

Таблица 2. Выход, чистота и целостность (RIN) РНК, полученной из крови с помощью разных методик
Table 2. Yield, purity, and integrity (RIN) of ribonucleic acid derived from blood by various methods

Протокол	Выход РНК, мкг	Средние значения A260/280	Средние значения RIN
Органическая экстракция			
Фенол-хлороформная экстракция с TRI reagent [46]	0,60	1,70	3,20
Фенол-хлороформная экстракция с TRIzol™ LS Reagent [48]	0,2–15,1	1,90	6,20
Выделение на спин-колонках			
Протокол со спин-колонками RNeasy Mini Kit [44]	0,90	2,10	8,80
Протокол со спин-колонками RiboPure RNA Purification Kit-Blood [44]	3,30	2,00	8,60
Протокол со спин-колонками Norgen Preserved Blood RNA Purification Kit I [45]	12,04	2,09	8,63
Протокол со спин-колонками Tempus Spin RNA Isolation Kit [45]	10,14	2,05	8,70
Протокол со спин-колонками PAXgene Blood RNA system [46]	0,10	2,00	6,00
Протокол со спин-колонками NucleoSpin RNA Blood Kit [46]	0,40	2,00	6,40
Протокол со спин-колонками Norgen Preserved Blood RNA Purification Kit I [47]	15,40	2,12	7,36
Протокол со спин-колонками Tempus™ Spin RNA Isolation Kit [47]	15,40	2,09	8,97
Протокол со спин-колонками Tempus™ 6-Port RNA Isolation Kit [47]	15,40	2,20	8,38
Протокол со спин-колонками RiboPure™ RNA Purification Kit [48]	5,0–43,9	1,90	4,60
Протокол со спин-колонками RNeasy Mini Kit [48]	0,0–6,20	2,10	6,90
Протокол со спин-колонками PAXgene Blood RNA Kit [48]	0,10–10,2	2,10	7,70
Протокол со спин-колонками LeukoLOCK™ Fractionation & Stabilization Kit [48]	0,10–3,70	2,00	7,60
Выделение на магнитных частицах			
Протокол с магнитными частицами NucliSENS easyMAG [44]	0,60	2,10	1,00
Протокол с магнитными частицами MagMAX™ for Stabilized Blood Tubes RNA Isolation Kit [45]	8,34	2,09	6,68
Ручной протокол с магнитными частицами MagMAX™ for Stabilized Blood Tubes RNA Isolation Kit [47]	15,40	2,12	7,20
Автоматизированный протокол с магнитными частицами MagMAX™ for Stabilized Blood Tubes RNA Isolation Kit [47]	15,40	2,09	7,85

Примечание: необходимое количество РНК для синтеза кДНК — 0,5 нг [52]; рекомендуемое количество РНК для РНК-секвенирования — 100 нг [53].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сегодня лаборатории имеют на вооружении достаточно большой набор проверенных методик для выделения (экстракции) и очистки нуклеиновых кислот — фенол-хлороформную экстракцию, высаливание, выделение на спин-колонках и магнитных частицах. Существуют универсальные

методики выделения и очистки ДНК и РНК из типового биоматериала — культур прокариотических и эукариотических клеток, растений, вирусных частиц, сред и т. д., однако при получении нуклеиновых кислот из неоднородных, комплексных образцов — таких как периферическая кровь, следует учитывать фактор гетерогенности и вводить

дополнительные меры на этапе очистки нуклеиновых кислот от примесей и биомолекул, чтобы предотвратить ингибирование протекающих при анализе процессов и искажение получаемых данных. Потребность в доступных, недорогих и эффективных протоколах извлечения ДНК и РНК из минимальных объемов биоматериала стимулирует оптимизацию и модификацию уже существующих протоколов и создание новых методик на новых физико-химических принципах. Мы находим целесообразными разработки в направлении автоматизации и масштабирования методик экстракции и очистки, уменьшения продолжительности и трудоемкости выполнения процедуры, снижении финансово-материальных затрат, а также их адаптации к применению с конкретными источниками нуклеиновых кислот. Кроме того, многообразие протоколов получения нуклеиновых кислот ставит исследователя

в затруднительное положение, вынуждая самостоятельно выбирать стратегию на основе имеющегося собственного опыта в этой области. При этом эффективность выделения и очистки нуклеиновых кислот с помощью коммерческих наборов варьируется даже в руках опытных лабораторных сотрудников, в том числе по объективным причинам, таким как различия в составе используемых буферных растворов и наборе расходных материалов у разных производителей. Именно поэтому остаются востребованными как экспериментальные, так и обзорные статьи, сравнивающие характеристики коммерческих и оригинальных протоколов, что позволит исследователям лучше ориентироваться при их выборе, а руководителям научных и медицинских учреждений внедрять эти методики в лабораторную и клиническую практику для решения важных практических задач, таких как HLA-генотипирование.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Williams R., Opelz G., Weil E., et al. The risk of transplant failure with HLA mismatch in recent times // *Transplantation*. 2016. Vol. 100. No. 9. P. e52–e53. DOI: 10.1097/tp.0000000000001365
- Ochoa-Díaz M.M., Daza-Giovanetty S., Gómez-Camargo D. Bacterial genotyping methods: from the basics to modern. *Host-Pathogen Interactions* // Humana Press. 2018. P. 13–20. DOI: 10.1007/978-1-4939-7604-1_2
- Westhoff C.M. Blood group genotyping // *Blood*. 2019. Vol. 133. No. 17. P. 1814–1820. DOI: 10.1182/blood-2018-11-833954
- Jackson S.E., Chester J.D. Personalised cancer medicine // *Int J Cancer*. 2014. Vol. 137. No. 2. P. 262–266. DOI: 10.1002/ijc.28940
- Shendure J., Findlay G.M., Snyder M.W. Genomic Medicine—Progress, Pitfalls, and Promise // *Cell*. 2019. Vol. 177. No. 1. P. 45–57. DOI: 10.1016/j.cell.2019.02.003
- Osoegawa K., Vayntrub T.A., Wenda S., et al. Quality control project of NGS HLA genotyping for the 17th International HLA and Immunogenetics Workshop // *Hum Immunol*. 2019. Vol. 80. No. 4. P. 228–236. DOI: 10.1016/j.humimm.2019.01.009
- Madden K., Chabot-Richards D. HLA testing in the molecular diagnostic laboratory // *Virchows Archiv*. 2018. Vol. 474. No. 2. P. 139–147. DOI: 10.1007/s00428-018-2501-3
- Gupta N. DNA extraction and polymerase chain reaction // *J Cytol*. 2019. Vol. 36. No. 2. P. 116–117. DOI: 10.4103/joc.joc_110_18
- Shehadul Islam M., Aryasomayajula A., Selvaganapathy P.R. A Review on Macroscale and Microscale Cell Lysis Methods // *Micromachines* (Basel). 2017. Vol. 8. No. 3. P. 83. DOI: 10.3390/mi8030083
- Mullegama S.V., Alberti M.O., Au C., et al. Nucleic Acid Extraction from Human Biological Samples // *Biobanking: Methods and Protocols*. 2018. P. 359–383. DOI: 10.1007/978-1-4939-8935-5_30
- Tan S.C., Yip B.C. DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present // *J Biomed Biotechnol*. 2009. Vol. 2009. P. 1–10. DOI: 10.1155/2009/574398
- Greathouse K.L., Sinha R., Vogtmann E. DNA extraction for human microbiome studies: the issue of standardization // *Genome Biol*. 2019. Vol. 20. ID 212. DOI: 10.1186/s13059-019-1843-8
- Singer V.L., Jones L.J., Yue S.T., Haugland R.P. Characterization of PicoGreen Reagent and Development of a Fluorescence-Based Solution Assay for Double-Stranded DNA Quantitation // *Anal Biochem*. 1997. Vol. 249. No. 2. P. 228–238. DOI: 10.1006/abio.1997.2177
- Georgiou C.D., Papapostolou I. Assay for the quantification of intact/fragmented genomic DNA // *Anal Biochem*. 2006. Vol. 358. No. 2. P. 247–256. DOI: 10.1016/j.ab.2006.07.035
- Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- Buckingham L. *Molecular Diagnostics*. 3 edition. Philadelphia: F.A. Davis Company, 2019. 576 p.
- Chomczynski P., Mackey K., Drews R., Wilfinger W. DNAzol®: A Reagent for the Rapid Isolation of Genomic DNA // *Biotechniques*. 1997. Vol. 22. No. 3. P. 550–553. DOI: 10.2144/97223pf01
- Chomczynski P., Sacchi N. Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction // *Anal Biochem*. 1987. Vol. 162. No. 1. P. 156–159. DOI: 10.1006/abio.1987.9999
- Simms D., Cizdziel P., Chomczynski P., et al. TRIzol: A new reagent for optimal single-step isolation of RNA // *Focus*. 1993. Vol. 15. No. 4. P. 532–535.
- Chomczynski P., Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction: twenty-something years on // *Nat Protoc*. 2006. Vol. 1. No. 2. P. 581–585. DOI: 10.1038/nprot.2006.83
- Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells // *Nucleic Acids Res*. 1988. Vol. 16. No. 3. P. 1215–1215. DOI: 10.1093/nar/16.3.1215
- Aljanabi S.M., Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques // *Nucleic Acids Res*. 1997. Vol. 25. No. 22. P. 4692–4693. DOI: 10.1093/nar/25.22.4692
- Suguna S., Nandal D., Kamble S., et al. Genomic DNA isolation from human whole blood samples by non-enzymatic salting out method // *Int J pharm sci*. 2014. Vol. 6. No. 6. P. 198–199.

24. Moradi M., Yari K., Khodarahmi R. A novel, efficient, fast and inexpensive DNA extraction protocol from whole blood applicable for studying drug-DNA interaction // *J Rep Pharm Sci*. 2014. Vol. 3. No. 1. P. 80–84.
25. Padhye V.V., York C., Burkiewicz A. Nucleic acid purification on silica gel and glass mixtures. United States patent US 5658548. 1997 Aug 19.
26. Kojima K., Ozawa S. Method for isolating and purifying nucleic acids. United States patent US 6905825. 2005.
27. Woodard D.L., Howard A.J., Down J.A. Process for purifying DNA on hydrated silica. United States patent US 5342931. 1994 Aug 30.
28. Gjerde D.T., Hoang L., Hornby D. RNA Purification and Analysis: Sample Preparation, Extraction, Chromatography // *RNA Purification and Analysis*. 2009. P. 1–16. DOI: 10.1002/9783527627196
29. Nargessi R.D. Magnetic isolation and purification of nucleic acids. United States patent US 6855499B1. 2005.
30. Berensmeier S. Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids // *Appl Microbiol Biotechnol*. 2006. Vol. 73. No. 3. P. 495–504. DOI: 10.1007/s00253-006-0675-0
31. Barbosa C., Nogueira S., Gadanho M., Chaves S. DNA extraction: finding the most suitable method // *Molecular Microbial Diagnostic Methods*. 2016. P. 135–154. DOI: 10.1016/b978-0-12-416999-9.00007-1
32. Albretsen C., Kalland K.-H., Haukanes B.-I., et al. Applications of magnetic beads with covalently attached oligonucleotides in hybridization: Isolation and detection of specific measles virus mRNA from a crude cell lysate // *Anal Biochem*. 1990. Vol. 189. No. 1. P. 40–50. DOI: 10.1016/0003-2697(90)90041-7
33. Bosnes M., Breivold E., Jobert L., et al. Solid-phase in vitro transcription and mRNA purification using Dynabeads™, superparamagnetic beads // 5th International mRNA Health Conference. 2017.
34. Philibert R.A., Zadorozhnyaya O., Beach S.R.H., Brody G.H. Comparison of the genotyping results using DNA obtained from blood and saliva // *Psychiatr Genet*. 2008. Vol. 18. No. 6. P. 275–281. DOI: 10.1097/ypg.0b013e3283060f81
35. Godderis L., Schouteden C., Tabish A., et al. Global Methylation and Hydroxymethylation in DNA from Blood and Saliva in Healthy Volunteers // *Biomed Res Int*. 2015. Vol. 2015. ID 845041. DOI: 10.1155/2015/845041
36. Elliott P., Peakman T. The UK Biobank sample handling and storage protocol for the collection, processing and archiving of human blood and urine // *Int J Epidemiol*. 2008. Vol. 37. No. 2. P. 234–244. DOI: 10.1093/ije/dym276
37. Chacon-Cortes D., Haupt L.M., Lea R.A., Griffiths L.R. Comparison of genomic DNA extraction techniques from whole blood samples: a time, cost and quality evaluation study // *Mol Biol Rep*. 2012. Vol. 39. No. 5. P. 5961–5966. DOI: 10.1007/s11033-011-1408-8
38. Ghaheri M., Kahrizi D., Yari K., et al. A comparative evaluation of four DNA extraction protocols from whole blood sample // *Cell Mol Biol*. 2016. Vol. 62. No. 3. P. 120–124.
39. Koshy L., Anju A.L., Hari Krishnan S., et al. Evaluating genomic DNA extraction methods from human whole blood using endpoint and real-time PCR assays // *Mol Biol Rep*. 2016. Vol. 44. No. 1. P. 97–108. DOI: 10.1007/s11033-016-4085-9
40. Sakyi S.A., Kumi B., Ephraim R.K.D., et al. Modified DNA extraction technique for use in resource-limited settings: comparison of salting out methods versus QIAamp blood mini kit // *Annals of Medical and Health Sciences Research*. 2017. Vol. 7. No. 3. P. 131–136.
41. Psifidi A., Dovas C.I., Bramis G., et al. Comparison of Eleven Methods for Genomic DNA Extraction Suitable for Large-Scale Whole-Genome Genotyping and Long-Term DNA Banking Using Blood Samples // *PLoS One*. 2015. Vol. 10. No. 1. ID e0115960. DOI: 10.1371/journal.pone.0115960
42. Metzker M.L. Sequencing technologies – the next generation // *Nat Rev Genet*. 2009. Vol. 11. No. 1. P. 31–46. DOI: 10.1038/nrg2626
43. Zeng X., Elwick K., Mayes C., et al. Assessment of impact of DNA extraction methods on analysis of human remain samples on massively parallel sequencing success // *Int J Legal Med*. 2018. Vol. 133. No. 1. P. 51–58. DOI: 10.1007/s00414-018-1955-9
44. Rodríguez A., Duyvejonck H., Van Belleghem J.D., et al. Comparison of procedures for RNA-extraction from peripheral blood mononuclear cells // *PLoS One*. 2020. Vol. 15. No. 2. ID e0229423. DOI: 10.1371/journal.pone.0229423
45. Richards J., Unger E.R., Rajeevan M.S. Simultaneous extraction of mRNA and microRNA from whole blood stabilized in tempus tubes // *BMC Res Notes*. 2019. Vol. 12. No. 1. ID 39. DOI: 10.1186/s13104-019-4087-5
46. Kim J.-H., Jin H.-O., Park J.-A., et al. Comparison of three different kits for extraction of high-quality RNA from frozen blood // *Springerplus*. 2014. Vol. 3. No. 1. ID 76. DOI: 10.1186/2193-1801-3-76
47. Aarem J., Brunborg G., Aas K.K., et al. Comparison of blood RNA isolation methods from samples stabilized in Tempus tubes and stored at a large human biobank // *BMC Res Notes*. 2016. Vol. 9. No. 1. ID 430. DOI: 10.1186/s13104-016-2224-y
48. Schwochow D., Serieys L.E.K., Wayne R.K., Thalmann O. Efficient recovery of whole blood RNA – a comparison of commercial RNA extraction protocols for high-throughput applications in wildlife species // *BMC Biotechnol*. 2012. Vol. 12. No. 1. ID 33. DOI: 10.1186/1472-6750-12-33
49. Fleige S., Pfaffl M.W. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance // *Mol Aspects Med*. 2006. Vol. 27. No. 2–3. P. 126–139. DOI: 10.1016/j.mam.2005.12.003
50. Fleige S., Walf V., Huch S., et al. Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR // *Biotechnol Lett*. 2006. Vol. 28. No. 19. P. 1601–1613. DOI: 10.1007/s10529-006-9127-2

REFERENCES

1. Williams R., Opelz G., Weil E., et al. The risk of transplant failure with HLA mismatch in recent times. *Transplantation*. 2016;100(9):e52–e53. DOI: 10.1097/tp.0000000000001365
2. Ochoa-Diaz MM, Daza-Giovanetty S, Gómez-Camargo D. Bacterial genotyping methods: from the basics to modern. Host-Pathogen Interactions. *Humana Press*. 2018;13–20. DOI: 10.1007/978-1-4939-7604-1_2
3. Westhoff CM. Blood group genotyping. *Blood*. 2019;133(17):1814–1820. DOI: 10.1182/blood-2018-11-833954
4. Jackson SE, Chester JD. Personalised cancer medicine. *Int J Cancer*. 2014;137(2):262–266. DOI: 10.1002/ijc.28940
5. Shendure J, Findlay GM, Snyder MW. Genomic Medicine-Progress, Pitfalls, and Promise. *Cell*. 2019;177(1):45–57. DOI: 10.1016/j.cell.2019.02.003

6. Osoegawa K, Vayntrub TA, Wenda S, et al. Quality control project of NGS HLA genotyping for the 17th International HLA and Immunogenetics Workshop. *Hum Immunol.* 2019;80(4):228–236. DOI: 10.1016/j.humimm.2019.01.009
7. Madden K, Chabot-Richards D. HLA testing in the molecular diagnostic laboratory. *Virchows Archiv.* 2018;474(2):139–147. DOI: 10.1007/s00428-018-2501-3
8. Gupta N. DNA extraction and polymerase chain reaction. *J Cytol.* 2019;36(2):116–117. DOI: 10.4103/joc.joc_110_18
9. Shehadul Islam M, Aryasomayajula A, Selvaganapathy PR. A Review on Macroscale and Microscale Cell Lysis Methods. *Micromachines (Basel).* 2017;8(3):83. DOI: 10.3390/mi8030083
10. Mullegama SV, Alberti MO, Au C, et al. Nucleic Acid Extraction from Human Biological Samples. *Biobanking: Methods and Protocols.* 2018:359–383. DOI: 10.1007/978-1-4939-8935-5_30
11. Tan SC, Yip BC. DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. *J Biomed Biotechnol.* 2009;2009:1–10. DOI: 10.1155/2009/574398
12. Greathouse KL, Sinha R, Vogtmann E. DNA extraction for human microbiome studies: the issue of standardization. *Genome Biol.* 2019;20:212. DOI: 10.1186/s13059-019-1843-8
13. Singer VL, Jones LJ, Yue ST, Haugland RP. Characterization of PicoGreen Reagent and Development of a Fluorescence-Based Solution Assay for Double-Stranded DNA Quantitation. *Anal Biochem.* 1997;249(2):228–238. DOI: 10.1006/abio.1997.2177
14. Georgiou CD, Papapostolou I. Assay for the quantification of intact/fragmented genomic DNA. *Anal Biochem.* 2006;358(2):247–256. DOI: 10.1016/j.ab.2006.07.035
15. Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual.* NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
16. Buckingham L. *Molecular Diagnostics. 3 edition.* Philadelphia: F.A. Davis Company; 2019. 576 p.
17. Chomczynski P, Mackey K, Drews R, Wilfinger W. DNAzol®: A Reagent for the Rapid Isolation of Genomic DNA. *Biotechniques.* 1997;22(3):550–553. DOI: 10.2144/97223pf01
18. Chomczynski P, Sacchi N. Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Anal Biochem.* 1987;162(1):156–159. DOI: 10.1006/abio.1987.9999
19. Simms D, Cizdziel P, Chomczynski P, et al. TRIzol: A new reagent for optimal single-step isolation of RNA. *Focus.* 1993;15(4):532–535.
20. Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc.* 2006;1(2):581–585. DOI: 10.1038/nprot.2006.83
21. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(3):1215–1215. DOI: 10.1093/nar/16.3.1215
22. Aljanabi SM, Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR- based techniques. *Nucleic Acids Res.* 1997;25(22):4692–4693. DOI: 10.1093/nar/25.22.4692
23. Suguna S, Nandal D, Kamble S, et al. Genomic DNA isolation from human whole blood samples by non-enzymatic salting out method. *Int J pharm pharm sci.* 2014;6(6):198–199.
24. Moradi M, Yari K, Khodarahmi R. A novel, efficient, fast and inexpensive DNA extraction protocol from whole blood applicable for studying drug-DNA interaction. *J Rep Pharm Sci.* 2014;3(1):80–84.
25. Padhye VV, York C, Burkiewicz A. *Nucleic acid purification on silica gel and glass mixtures.* United States patent US 5658548. 1997 Aug 19.
26. Kojima K, Ozawa S. *Method for isolating and purifying nucleic acids.* United States patent US 6905825. 2005.
27. Woodard DL, Howard AJ, Down JA. *Process for purifying DNA on hydrated silica.* United States patent US 5342931. 1994 Aug 30.
28. Gjerde DT, Hoang L, Hornby D. RNA Purification and Analysis: Sample Preparation, Extraction, Chromatography. *RNA Purification and Analysis.* 2009:1–16. DOI: 10.1002/9783527627196
29. Nargessi RD. *Magnetic isolation and purification of nucleic acids.* United States patent US 6855499B1. 2005.
30. Berensmeier S. Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2006;73(3):495–504. DOI: 10.1007/s00253-006-0675-0
31. Barbosa C, Nogueira S, Gadanho M, Chaves S. DNA extraction: finding the most suitable method. *Molecular Microbial Diagnostic Methods.* 2016:135–154. DOI: 10.1016/b978-0-12-416999-9.00007-1
32. Albretsen C, Kalland K-H, Haukanes B-I, et al. Applications of magnetic beads with covalently attached oligonucleotides in hybridization: Isolation and detection of specific measles virus mRNA from a crude cell lysate. *Anal Biochem.* 1990;189(1):40–50. DOI: 10.1016/0003-2697(90)90041-7
33. Bosnes M, Breivold E, Jobert L, et al. Solid-phase in vitro transcription and mRNA purification using Dynabeads™, superparamagnetic beads. *5th International mRNA Health Conference.* 2017.
34. Philibert RA, Zadorozhnyaya O, Beach SRH, Brody GH. Comparison of the genotyping results using DNA obtained from blood and saliva. *Psychiatr Genet.* 2008;18(6):275–281. DOI: 10.1097/ypg.0b013e3283060f81
35. Godderis L, Schouteden C, Tabish A, et al. Global Methylation and Hydroxymethylation in DNA from Blood and Saliva in Healthy Volunteers. *Biomed Res Int.* 2015;2015:845041. DOI: 10.1155/2015/845041
36. Elliott P, Peakman T. The UK Biobank sample handling and storage protocol for the collection, processing and archiving of human blood and urine. *Int J Epidemiol.* 2008;37(2):234–244. DOI: 10.1093/ije/dym276
37. Chacon-Cortes D, Haupt LM, Lea RA, Griffiths LR. Comparison of genomic DNA extraction techniques from whole blood samples: a time, cost and quality evaluation study. *Mol Biol Rep.* 2012;39(5):5961–5966. DOI: 10.1007/s11033-011-1408-8
38. Ghaheeri M, Kahrizi D, Yari K, et al. A comparative evaluation of four DNA extraction protocols from whole blood sample. *Cell Mol Biol.* 2016;62(3):120–124.
39. Koshy L, Anju AL, Harikrishnan S, et al. Evaluating genomic DNA extraction methods from human whole blood using endpoint and real-time PCR assays. *Mol Biol Rep.* 2016;44(1):97–08. DOI: 10.1007/s11033-016-4085-9
40. Sakyi SA, Kumi B, Ephraim RKD, et al. Modified DNA extraction technique for use in resource-limited settings: comparison of salting out methods versus QIAamp blood mini kit. *Annals of Medical and Health Sciences Research.* 2017;7(3):131–136.
41. Psifidi A, Dovas CI, Bramis G, et al. Comparison of Eleven Methods for Genomic DNA Extraction Suitable for Large-Scale Whole-Genome Genotyping and Long-Term DNA Banking Using Blood Samples. *PLoS One.* 2015;10(1):e0115960. DOI: 10.1371/journal.pone.0115960
42. Metzker ML. Sequencing technologies – the next generation. *Nat Rev Genet.* 2009;11(1):31–46. DOI: 10.1038/nrg2626

43. Zeng X, Elwick K, Mayes C, et al. Assessment of impact of DNA extraction methods on analysis of human remain samples on massively parallel sequencing success. *Int J Legal Med.* 2018;133(1):51–58. DOI: 10.1007/s00414-018-1955-9
44. Rodríguez A, Duyvejonck H, Van Bellegheem JD, et al. Comparison of procedures for RNA-extraction from peripheral blood mononuclear cells. *PLoS One.* 2020;15(2):e0229423. DOI: 10.1371/journal.pone.0229423
45. Richards J, Unger ER, Rajeevan MS. Simultaneous extraction of mRNA and microRNA from whole blood stabilized in tempus tubes. *BMC Res Notes.* 2019;12(1):39. DOI: 10.1186/s13104-019-4087-5
46. Kim J-H, Jin H-O, Park J-A, et al. Comparison of three different kits for extraction of high-quality RNA from frozen blood. *Springerplus.* 2014;3(1):76. DOI: 10.1186/2193-1801-3-76
47. Aarem J, Brunborg G, Aas KK, et al. Comparison of blood RNA isolation methods from samples stabilized in Tempus tubes and stored at a large human biobank. *BMC Res Notes.* 2016;9(1):430. DOI: 10.1186/s13104-016-2224-y
48. Schwochow D, Serieys LEK, Wayne RK, Thalmann O. Efficient recovery of whole blood RNA – a comparison of commercial RNA extraction protocols for high-throughput applications in wildlife species. *BMC Biotechnol.* 2012;12(1):33. DOI: 10.1186/1472-6750-12-33
49. Fleige S, Pfaffl MW. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol Aspects Med.* 2006;27(2-3):126–139. DOI: 10.1016/j.mam.2005.12.003
50. Fleige S, Walf V, Huch S, et al. Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. *Biotechnol Lett.* 2006;28(19):1601–1613. DOI: 10.1007/s10529-006-9127-2

ОБ АВТОРАХ

***Илья Владимирович Маркин**, кандидат технических наук;
e-mail: ilya.markin.92@bk.ru; eLibrary SPIN: 6021-7645

Олег Александрович Баранов, старший оператор

Дмитрий Алексеевич Байран, старший оператор;
e-mail: dima.bayran@mail.ru

Елена Сергеевна Щелканова, кандидат биологических наук;
e-mail: shchelkanova_el@mail.ru; eLibrary SPIN: 8396-0602

Евгений Александрович Журбин, кандидат медицинских наук;
e-mail: zhurbin-90@mail.ru; eLibrary SPIN: 8426-1354

AUTHORS INFO

***Il'ya V. Markin**, candidate of technical sciences;
e-mail: ilya.markin.92@bk.ru; eLibrary SPIN: 6021-7645

Oleg A. Baranov, senior operator

Dmitry A. Bayran, senior operator;
e-mail: dima.bayran@mail.ru

Elena S. Shchelkanova, candidate of biological sciences;
e-mail: shchelkanova_el@mail.ru; eLibrary SPIN: 8396-0602

Evgeny A. Zhurbin, candidate of medical sciences;
e-mail: zhurbin-90@mail.ru; eLibrary SPIN: 8426-1354

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author