

© ВОЛКОВ А.Н., 2016

УДК 612.112.94.083

Волков А.Н.^{1,2}

ФИКСИРОВАННЫЕ ЛИМФОЦИТЫ ЧЕЛОВЕКА КАК ИСТОЧНИК ДНК ДЛЯ ПЦР-ДИАГНОСТИКИ

¹ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Минздрава Российской Федерации, 650066, г. Кемерово;

²ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет», 650043, г. Кемерово, Российская Федерация

Представлены результаты изучения количественных и качественных характеристик образцов ДНК, выделенной сорбентным методом из лимфоцитов человека, которые прошли этанол-уксусную фиксацию для приготовления цитогенетических препаратов. Концентрация ДНК варьировала в пределах 18,9–213,2 нг/мкл, а показатель A_{260}/A_{280} составлял 1,47–2,53. Все образцы оказались пригодными для проведения ПЦР в ходе выявления AZF-делеций Y-хромосомы. Рассмотренный способ выделения ДНК высокоэффективен в отношении фиксированных лимфоцитов и может использоваться в медико-биологических исследованиях.

Ключевые слова: выделение ДНК; ПЦР-диагностика.

Для цитирования: Волков А.Н. Фиксированные лимфоциты человека как источник ДНК для ПЦР-диагностики. Клиническая лабораторная диагностика. 2016; 61 (12): 819-821. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2016-61-12-819-821>

Volkov A.N.^{1,2}

THE FIXED HUMAN LYMPHOCYTES AS A SOURCE OF DNA FOR POLYMERASE CHAIN REACTION DIAGNOSTIC

¹The Kemerovskii state medical university of Minzdrav of Russia, 650066 Kemerovo, Russia

²The Kemerovskii state university, 650043 Kemerovo, Russia

The article presents the results of studying of quantitative and qualitative characteristics of DNA samples separated by sorbate technique from human lymphocytes went through ethanol acetic fixation for preparation of cytogenetic specimen. The concentration of DNA varied within range 18.9-213.2 ng per mkl. The rate A_{260}/A_{280} amounted to 1.47-2.53. All samples were found suitable for application of polymerase chain reaction during detection of AZF-deletions of Y-chromosome. The considered mode of separation of DNA is highly efficient in respect of fixed lymphocytes and it can be applied in medical biologic studies.

Key words: DNA separation; polymerase chain reaction diagnostic

For citation: Volkov A.N. The fixed human lymphocytes as a source of DNA for polymerase chain reaction diagnostic. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2016; 61 (12): 819-821. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2016-61-12-819-821>

For correspondence: Volkov A.N., candidate of biologic sciences, senior researcher of the central research laboratory of Kemerovskii state medical university, associate professor of the chair of genetics of Kemerovskii state university. e-mail: volkov_alex@rambler.ru

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Financing. The study had no sponsor support.

Received 04.05.2016
Accepted 15.05.2016

В медико-биологических исследованиях используются разнообразные источники нуклеиновых кислот: от эпителиальных клеток до сухих пятен крови и постоянных препаратов тканей человека [1–4]. Выделение ДНК из фиксированных образцов является затруднительным. При обработке клеток человека этанол-уксусным или метанол-уксусным фиксатором происходят обезвоживание биологического материала, денатурация макромолекул и снижение их растворимости, вследствие чего становится невозможным или сильно затрудняется переход нуклеиновых кислот в водные растворы.

Несмотря на большое разнообразие протоколов выделения нуклеиновых кислот, до сих пор не создана унифицированная схема получения препаратов ДНК из фиксированных лимфоцитов человека. Вместе с тем данный вид биологиче-

ского материала в ряде случаев является единственным потенциальным источником ДНК. Например, в практической деятельности цитогенетических лабораторий – как научных, так и клинических, – фиксированные лимфоциты используются для приготовления препаратов хромосом и являются коллекционным материалом [5–7]. При необходимости образцы такой коллекции могут быть использованы для получения и дальнейшего анализа нуклеиновых кислот – например, в ходе ПЦР-диагностики.

Цель исследования – оценка количественных и качественных характеристик ДНК, выделенной сорбентным методом из фиксированных лимфоцитов человека, и ее пригодности для дальнейшего проведения ПЦР.

Материал и методы. Для проведения исследования использовались 43 образца лимфоцитов человека в этанол-уксусном фиксаторе (3:1), ранее приготовленные для цитогенетического исследования и хранящиеся в коллекции биоматериалов ЦНИЛ ФГБОУ ВО КемГМУ. Исходные клеточные суспензии объемом около 10 мл обогащали лимфоцитами путем центрифугирования в течение 10 минут при 1200 об/

Для корреспонденции: Волков Алексей Николаевич, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО КемГМУ, доц. каф. генетики ФГБОУ ВО КемГУ, e-mail: volkov_alex@rambler.ru

ГЕМАТОЛОГИЯ

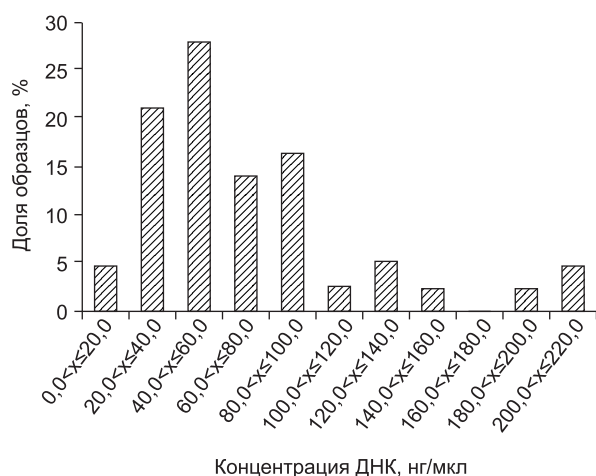


Рис. 1. Концентрация ДНК в изученных образцах, нг/мкл.

мин. Осажденные клетки с фиксатором общим объемом 1 мл переносили в микропробирки и повторно центрифугировали 10 минут при 10 000 об/мин. После полного удаления надосадочной жидкости препараты подсушивали при 55°C в течение 5 мин. Полученный материал ресуспендировали в 100 мкл физиологического раствора. Выделение ДНК из приготовленного препарата осуществляли сорбентным методом с использованием комплекта реагентов «Универсальная пробоподготовка» (НПФ «Генлаб», Россия) по методике производителя.

Количественные и качественные характеристики образцов оценивали спектрометрически на приборе NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Inc.). Концентрацию ДНК измеряли путем определения поглощения образцом УФ-излучения с длиной волны 260 нм (A_{260}). Степень очистки материала от белковых примесей оценивали, измеряя отношение поглощения УФ-излучения при 260 нм и 280 нм (A_{260}/A_{280}).

В дальнейшем 33 образца выделенной ДНК использовали для постановки мультиплексной ПЦР при диагностике AZF-делетий в субрегионах AZFa, AZFb, AZFc Y-хромосомы с детекцией результата электрофоретическим способом и в режиме реального времени на приборе CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc.). При этом использовали коммерческие наборы «AZF-делетии» (НПФ «Литех», Россия). Анализ эффективности ПЦР в реальном времени осуществляли пороговым методом [8, 9]. Для всех образцов регистрировали индивиду-

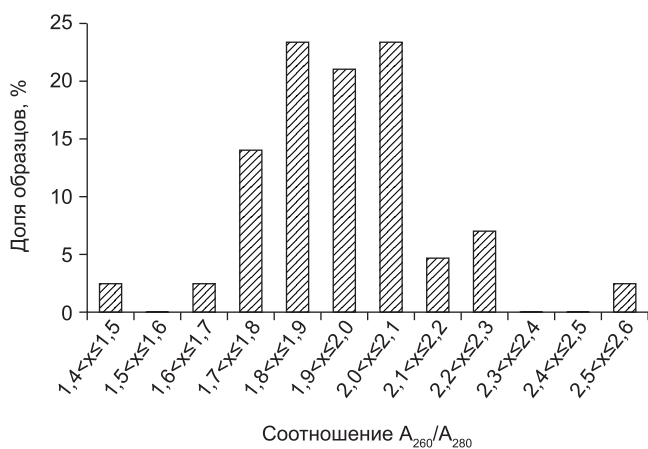


Рис. 2. Соотношение A_{260}/A_{280} в изученных образцах.

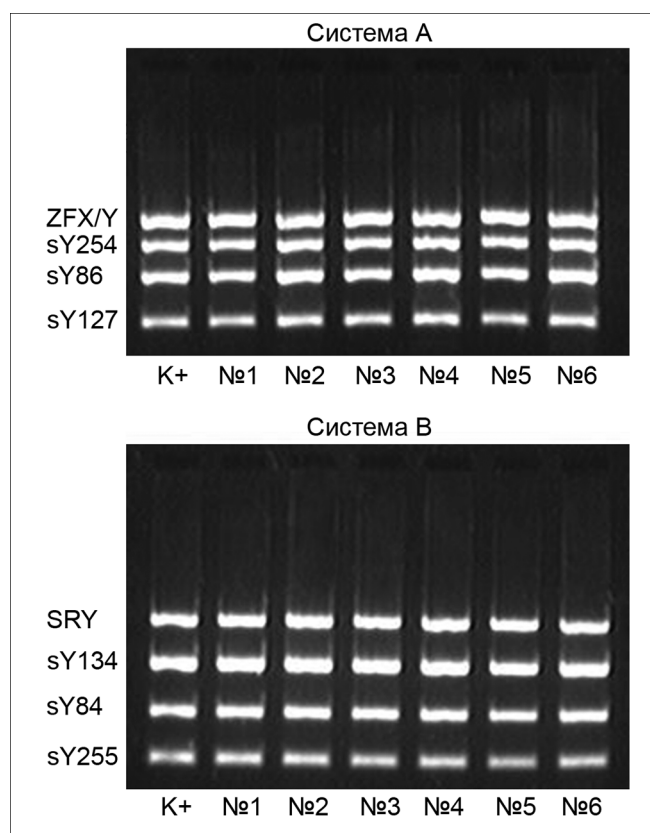


Рис. 3. ПЦР-амплификация STS-маркеров с использованием системы «AZF-делетии» и ДНК из фиксированных лимфоцитов.

альные значения порогового цикла (Ct), при котором кривая флуоресценции пересекает пороговую линию, установленную согласно рекомендации разработчика тест-системы.

Статистический анализ осуществляли с использованием программы «STATISTICA, v. 5.5» (StatSoft, Inc.). Так как распределение значений большинства изучаемых показателей не соответствовало нормальному, в качестве выборочных характеристик использовали пределы варьирования и медиану.

Результаты и обсуждение. Результаты спектрометрического изучения образцов показали, что концентрация ДНК, выделенной из фиксированных лимфоцитов, варьирует в широких пределах (18,9–213,2 нг/мкл) при значении медианы 58,7 нг/мкл (рис. 1). Это может быть связано с различной эффективностью культивирования лимфоцитов, неконтролируемыми потерями клеток при их фиксации и прочими факторами. Тем не менее все изученные образцы содержат ДНК в количестве, превышающем минимально необходимое для проведения ПЦР (около 10 нг/мкл) [4, 10]. Величина показателя A_{260}/A_{280} для изученных образцов варьировала в пределах 1,47–2,53 при значении медианы 1,96 (рис. 2). Большинство образцов (95,3%) характеризовались хорошей и отличной степенью удаления белковых примесей (величина A_{260}/A_{280} от 1,7), что сопоставимо с эффективностью очистки препаратов ДНК из других биоматериалов [3, 4, 10].

Рассмотренные показатели не могут в полной мере охарактеризовать пригодность образцов для проведения ПЦР, так как они не позволяют выявить все потенциальные ингибиторы амплификации, сохранившиеся в препаратах после выделения ДНК. Нельзя также исключить попадание в образец веществ, дезактивирующих флуоресцентные зонды или обладающие собственной флуоресценцией. Поэтому наибо-

Показатели ПЦР с детекцией в реальном времени, выполненной с использованием системы «AZF-делеции» и ДНК из фиксированных лимфоцитов

| Система | Локус | Канал детекции | Переделы варьирования Ct (n = 33) | Медиана Ct (n = 33) |
|---------|-------|----------------|-----------------------------------|---------------------|
| A | ZFX/Y | HEX | 15,03–18,42 | 16,36 |
| B | SRY | HEX | 15,45–19,59 | 17,31 |
| A | sY86 | FAM | 15,00–17,96 | 16,50 |
| B | sY84 | FAM | 13,93–18,50 | 16,21 |
| A | sY127 | ROX | 13,39–18,48 | 15,31 |
| B | sY134 | ROX | 13,74–18,29 | 15,65 |
| A | sY254 | Cy5 | 14,40–18,95 | 16,12 |
| B | sY255 | Cy5 | 12,78–16,79 | 14,75 |

лее объективным способом такой оценки можно считать постановку ПЦР.

Для этого использовали образцы ДНК, выделенной из фиксированных лимфоцитов фертильных мужчин. Проводилась амплификация STS-маркеров, локализованных в субрегионах AZFa (sY84 и sY86), AZFb (sY127 и sY134), AZFc (sY254 и sY255) Y-хромосомы человека с последующей электрофоретической детекцией продуктов (рис. 3). Мишенями внутреннего контроля являлись локусы ZFX/Y и SRY. Для каждого исследуемого образца одновременно выполняли 2 теста (система А и система В), что повышает надежность результатов анализа. В качестве положительного контрольного образца была использована ДНК фертильного мужчины (К+), входящая в комплект реагентов «AZF-делеции».

Все исследуемые образцы ДНК характеризовались высокой эффективностью ПЦР по всем маркерам, не уступая по качеству положительному контрольному образцу. Это свидетельствует об отсутствии деградации ДНК в ходе самой процедуры выделения и о достаточной ее концентрации в конечном растворе. Кроме того, в пробе отсутствуют ингибиторы ПЦР, или же их содержание не влияет существенно на ход процесса.

На следующем этапе для выявления ранее указанных STS-маркеров Y-хромосомы выполнялась мультиплексная ПЦР с регистрацией накопления флуоресценции в режиме реального времени по 4 каналам детекции (FAM, HEX, ROX, Cy5). При этом каждый из флуорофоров был ассоциирован с одним из субрегионов AZF-области или участком внутреннего контроля вне AZF-области. При отсутствии делеций в указанных участках уровень флуоресценции по всем каналам детекции в амплифицируемых образцах должен превышать установленное пороговое значение до 28-го цикла.

Во всех случаях ПЦР была проведена успешно. Как и следовало ожидать, для образцов фертильных мужчин выявлялись все STS-маркеры субрегионов AZFa, AZFb, AZFc Y-хромосомы, наряду с маркерами внутреннего контроля. Уровень флуоресценции по всем каналам детекции во всех образцах достигал порогового значения раньше 28-го цикла ПЦР (см. таблицу). Индивидуальная величина Ct отдельных

образцов варьировала от 12,78 (система В, канал Cy5) до 19,59 (система В, канал HEX). При этом значение медианы Ct было минимальным (14,75) при амплификации локуса sY255 (система В, канал Cy5) и максимальным (17,31) при амплификации локуса SRY (система В, канал HEX).

Заключение. Лимфоциты человека, прошедшие этанол-уксусную фиксацию в ходе приготовления цитогенетических препаратов, могут служить источником ДНК для дальнейших молекулярно-генетических исследований. Количественные и качественные характеристики ДНК, выделенной сорбентным способом из фиксированных лимфоцитов, удовлетворяют требованиям к образцам, предназначенным для выполнения ПЦР. Это позволяет считать обсуждаемую методику выделения ДНК пригодной для использования в медико-биологических исследованиях, связанных с получением нуклеиновых кислот.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания на выполнение НИР ФГБОУ ВО КемГМУ за счет бюджетного финансирования.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Ghatak S., Muthukumar R.B., Nachimuthu S.K. A simple method of genomic DNA extraction from human samples for PCR-RFLP analysis. *J. Biomol. Tech.* 2013; 24 (4): 224–31.
- Hue N.T., Chan N.D., Phong P.T., Linh N.T., Giang N.D. Extraction of human genomic DNA from dried blood spots and hair roots. *Int. J. Biosci. Biochem. Bioinforma.* 2012; 2 (1): 21–6.
- Khare P., Raj V., Chandra S., Agarwal S. Quantitative and qualitative assessment of DNA extracted from saliva for its use in forensic identification. *J. Forensic. Dent. Sci.* 2014; 6 (2): 81–5.
- Thyagarajan B., Anderson K.E., Kong F., Selk F.R., Lynch C.F., Gross M.D. New approaches for genotyping paraffin wax embedded breast tissue from patients with cancer: the Iowa women's health study. *J. Clin. Pathol.* 2005; 58 (9): 955–61.
- Fučić A., Želježić D., Kašuba V., Kopjar N., Rozgaj R., Lasan R. et al. Stable and unstable chromosome aberrations measured after occupational exposure to ionizing radiation and ultrasound. *Croat. Med. J.* 2007; 48 (3): 371–7.
- Orjuela M.A., Liu X., Warburton D., Siebert A.L., Cujar C., Tang D. et al. Prenatal PAH exposure is associated with chromosome-specific aberrations in cord blood. *Mutat. Res.* 2010; 703 (2): 108–14.
- Wu J., Morris J.K. The population prevalence of Down's syndrome in England and Wales in 2011. *Eur. J. Hum. Genet.* 2013; 21 (9): 1016–9.
- Ruijter J.M., Ramakers C., Hoogaars W.M., Karlen Y., Bakker O., Van den Hoff M.J. et al. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res.* 2009; 37 (6): e45.
- Stowers C.C., Haselton F.R., Boczek E.M. An analysis of quantitative PCR reliability through replicates using the Ct method. *J. Biomed. Sci. Eng.* 2010; 3 (5): 459–69.
- Rethmeyer J.A., Tan X., Manzardo A., Schroeder S.R., Butler M.G. Comparison of biological specimens and DNA collection methods for PCR amplification and microarray analysis. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2013; 51 (5): e79–83.

Поступила 04.05.16
Принята к печати 15.05.16