

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023

Жигалева О.Н.¹, Ильин И.И.^{1,2}, Марданлы С.Г.^{1,2}, Марданлы С.С.¹

РАЗРАБОТКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ИЗ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА НА ОСНОВЕ МАГНИТНОЙ АДСОРБЦИИ

¹АО «ЭКОлаб», 142530, г. Электрогорск, Россия;

²ГОУВО МО «Государственный гуманитарно-технологический университет» (ГОУ ВО МО «ГГТУ»), 142611, г. Орехово-Зуево, Россия

В статье рассматриваются этапы разработки набора реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) из биологических образцов. Выделенные при помощи разрабатываемого набора ДНК и РНК в дальнейшем могут найти своё применение в проведении амплификации нуклеиновых кислот и детектировании накопления продуктов амплификации методом ПЦР в реальном времени. Описана сфера применений метода полимеразной цепной реакции, его преаналитические этапы; дана краткая характеристика сильных и слабых сторон основных методов выделения нуклеиновых кислот, подробно расписана эффективность метода выделения при помощи магнитного сорбента. Раскрыт поэтапный ход разработки набора: приведено описание этапов протокола выделения нуклеиновых кислот, их корректировка в ходе апробации набора реагентов на разных образцах; описана необходимость грамотного подбора реактивов и магнитного сорбента; представлены данные сравнения результатов экстракции разрабатываемого набора реагентов и коммерческих наборов для выделения нуклеиновых кислот. За время разработки выделялись: ДНК ВГВ, ДНК ИППП, ДНК человека; также выделялись РНК ВГС. Метод выделения разрабатываемого набора – магнитная адсорбция, методы выделения коммерческих наборов, используемых для сравнения результатов – магнитная адсорбция и преципитация. В ходе разработки набора удалось добиться того, что, в конечном счёте, результаты качественного анализа выделенных нуклеиновых кислот при помощи разрабатываемого набора и коммерческих наборов совпадают. На основании данных, полученных в ходе объёмной разработки набора для экстракции нуклеиновых кислот, сформулирован вывод о важности правильного выделения ДНК и РНК для их дальнейшей амплификации и регистрации данных.

Ключевые слова: разработка набора реагентов; выделение нуклеиновых кислот; ДНК; РНК; полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией в реальном времени; амплификация нуклеиновых кислот; экстракция; магнитные частицы; пробоподготовка.

Для цитирования: Жигалева О.Н., Ильин И.И., Марданлы С.Г., Марданлы С.С. Разработка набора реагентов для выделения нуклеиновых кислот из клинического материала на основе магнитной адсорбции. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2023; 68 (10): 650-657.

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-10-650-657>.

Для корреспонденции: Жигалева Ольга Николаевна, руководитель научно-производственного отдела НПО ПЦР АО «ЭКОлаб»; e-mail: jjgon@mail.ru

Финансирование. Исследование финансировало АО «ЭКОлаб».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 08.09.2023

Принята к печати 28.09.2023

Опубликовано 00.00.2023

Zhigaleva O.N.¹, Ilin I.I.^{1,2}, Mardanly S.G.^{1,2}, Mardanly S.S.^{1,2}

DEVELOPMENT OF A SET OF REAGENTS FOR THE ISOLATION OF NUCLEIC ACIDS FROM CLINICAL MATERIAL BASED ON MAGNETIC ADSORPTION

¹PJSC "ECOLab", 142530, Elektrogorsk, Russia;

²State educational institution of higher education of the Moscow region "State Humanitarian University of Technology" (GGTU), 142611, Orekhovo-Zuyevo, Russia

The article is devoted to the development of a set of reagents for the isolation of nucleic acids (DNA and RNA) from biological samples. DNA and RNA isolated using the developed set of DNA and RNA can later find their application in carrying out the amplification of nucleic acids and detecting the accumulation of amplification products by real-time PCR. The scope of application of the polymerase chain reaction method, its preanalytical stages are described; a brief description of the strengths and weaknesses of the main methods for isolating nucleic acids is given, and the effectiveness of the method of isolation using a magnetic sorbent is described in detail. The stage-by-stage development of the kit is disclosed: a description of the stages of the nucleic acid isolation protocol is given, their adjustment during testing of the kit of reagents on different samples; the need for a competent selection of reagents and a magnetic sorbent is described; presents data comparing the results of extraction of the developed set of reagents and commercial kits for the isolation of nucleic acids. During the development, the following were isolated: HBV DNA, STI DNA, human DNA; HCV RNA was also isolated. The extraction method of the developed kit is magnetic sorption, the extraction methods of commercial kits used to compare the results are magnetic sorption and precipitation. During the development of the kit, it was possible to ensure that, ultimately, the results of a qualitative analysis of nucleic acid extracts using the developed kit and commercial kits coincide. Based on the data obtained during the volumetric development of a kit for the extraction of nucleic acids, a conclusion was made about the importance of correct extraction of DNA and RNA for their further amplification and data recording.

Key words: reagent set development; nucleic acids isolation; DNA; RNA; real-time reverse transcription polymerase chain reaction; nucleic acids amplification; extraction; magnetic particles; sample preparation.

For citation: Zhigaleva O.N., Ilin I.I., Mardanly S.G., Mardanly S.S. Development of a set of reagents for the isolation of nucleic acids from clinical material based on magnetic adsorption. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2023; 68 (10): 650-657. (in Russ.)
DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-10-650-657>.

For correspondence: Zhigaleva Ol'ga Nikolaevna, specialist of the Innovative Development Department CJSC «EKOlab»; e-mail: jigon@mail.ru

Information about authors:

Zhigaleva O.N., <https://orcid.org/0000-0002-5003-1089>;

Ilin I.I., <https://orcid.org/0009-0003-0316-7260>;

Mardanly S.G., <https://orcid.org/0000-0003-3650-2363>;

Mardanly S.S., <https://orcid.org/0000-0002-4440-6075>.

Acknowledgment. *The study was funded by PJSC «ECOLab».*

Conflict of interests. *The authors declare that there is no conflict of interest.*

Received 08.09.2023

Accepted 28.09.2023

Published 00.00.2023

Введение. ПЦР - это высокоспецифичный метод, основанный на многократном избирательном копировании определённого участка нуклеиновой кислоты при помощи ферментов *in vitro* [1]. Полимеразная цепная реакция применяется в первую очередь в медицинской диагностике вирусных и наследственных заболеваний, в области криминалистики для генетической дактилоскопии, а также в областях клонирования и секвенирования ДНК. Преаналитическими этапами, необходимыми для постановки ПЦР, можно назвать первичный отбор биологического материала, его транспортировку, хранение, а также экстракцию нуклеиновых кислот для пробоподготовки. Существует несколько особенностей выполнения пробоподготовки для целей проведения ПЦР с флуоресцентной регистрацией результатов. В частности, ПЦР «в реальном времени» предъявляет особые требования к фоновой флуоресценции образца и к наличию в образце примесей, денатурирующих флуоресцентную пробу [2]. Это говорит о необходимости предварительной очистки от ингибиторов ПЦР на этапе выделения нуклеиновых кислот из исследуемой пробы.

Основной задачей этапа экстракции является получение очищенного препарата ДНК для последующей реакции амплификации. Для получения высокоочищенных нуклеиновых кислот необходимо использовать наиболее эффективные методы выделения ДНК [3]. В анализе РНК выделение также является ключевым преаналитическим этапом в ПЦР исследовании. Сама экстракция РНК является трудоемким процессом и занимает много времени [4].

Говоря о ПЦР на рынке, то в последние годы переносимые молекулярные тесты заняли важное место в диагностике инфекционных заболеваний благодаря их высокой чувствительности и специфичности [5]. Существуют разнообразные коммерческие наборы, применяемые в клинической диагностике и исследованиях. Примерами данных наборов могут послужить комплекты реагентов для выделения нуклеиновых кислот из клинических образцов, выделения ДНК ВГВ, РНК ВГС для дальнейшего проведения ПЦР-диагностики. Все они обладают своими особен-

ностями, но независимо от различий протоколов выделения в коммерческих наборах у них есть общие шаги в проведении оптимальной экстракции:

- лизис клеток и ядра;
- денатурация нуклеопротеиновых комплексов, в результате которой происходит инактивация нуклеаз с дальнейшим удалением ингибиторов [6];
- отделение нуклеиновых кислот от прочего клеточного содержимого;
- очистка и концентрирование нуклеиновых кислот [7].

Вышеназванные этапы выделения ДНК и РНК находят своё применение в разнообразных методах экстракции нуклеиновых кислот из биологических образцов [8]. Для разработки собственного набора для экстракции нуклеиновых кислот необходимо выбрать наиболее эффективный метод выделения. Сильными и слабыми сторонами основных методов экстракции нуклеиновых кислот можно назвать:

- Фенол-хлороформенная экстракция: дешёвое выделение высокоочищенных нуклеиновых кислот, однако сам метод является долгим в реализации и токсичным для человеческого организма. На основании токсичности наборы экстракции, применяющиеся в данном методе, в продаже встречаются очень редко;

- Экстракция с помощью силики: метод прост, быстр и экономичен в затрачиваемых реактивах, но недостатком является сложность экстракции нуклеиновых кислот из небольшого количества биологического материала. Существует большое число коммерческих наборов, использующих данный метод экстракции;

- Экстракция нуклеиновых кислот с помощью ионообменной смолы. Ряд преимуществ данного метода, а именно низкий риск контаминации, экономичность, скорость и простота выделения перекрываются серьёзными недостатками, к которым можно отнести плохую степень очистки выделенных нуклеиновых кислот, а также высокий риск ингибирования самими смолами. Основывающиеся на данном методе наборы редки и чаще всего применяются в узконаправленных лабораториях;

- Экстракция нуклеиновых кислот на спин-колонках. Отмечается как высокая степень чистоты выделенных нуклеиновых кислот при помощи спин-колонок, так и высокий шанс контаминации. Метод является крайне дорогим, поэтому основанных на нём коммерческих наборов крайне мало на рынке;

- Экстракция нуклеиновых кислот на магнитных частицах. Главными преимуществами данного метода можно назвать: минимальный набор необходимого оборудования, крайне низкий риск контаминации, высокая степень очистки продуктов выделения, лёгкость проведения экстракции. Недостатком можно назвать относительную дороговизну метода. На основании многочисленных достоинств метода, коммерческих наборов выделения по данному методу много.

Эффективная экстракция нуклеиновых кислот имеет важное значение при разработке набора реагентов. Оптимальный метод экстракции должен удовлетворять следующим условиям: скорость, короткое время работы, экономичность, высокая чувствительность и специфичность, хорошая воспроизводимость и безопасность [9]. Он будет наиболее подходящим для использования со всеми видами образцов и патогенов. Однако в настоящее время не существует единого метода экстракции, удовлетворяющего всем этим условиям. Напротив, существуют значительные различия между наборами для экстракции, поскольку нуклеиновые кислоты могут различаться в конкретных клинических образцах. Таким образом, важно тщательно оценить эффективность любого метода экстракции, используемого в лаборатории клинической диагностики и микробиологии и выбрать наиболее подходящий.

На основании вышесказанного для разработки набора был выбран именно метод магнитной адсорбции в рамках выделения нуклеиновых кислот. Сущность метода заключается в связывании нуклеиновой кислоты с веществом, покрывающим магнитные частицы. Такими веществами могут быть силика, целлюлоза,

сефадекс. После этапа лизиса к лизату при перемешивании добавляются магнитные частицы для связывания с нуклеиновыми кислотами. Дальнейшим шагом является фиксация твёрдой фазы при помощи магнитного штатива. После отбора жидкой фазы происходит промывка для дополнительной очистки нуклеиновых кислот от примесей и элюция для дальнейшего исследования ДНК и РНК, в том числе и ПЦР-методами. Процесс выделения нуклеиновых кислот при помощи нуклеиновых кислот легко автоматизируется, поэтому работа автоматических станции выделения зачастую основывается на вышеназванной методике.

Цель - разработка набора реагентов для выделения нуклеиновых кислот из клинического материала на основе магнитной адсорбции.

Материал и методы. В ходе разработки набора реагентов в выделении нуклеиновых кислот были использованы расходные материалы:

Пробирки и наконечники, с маркировкой «RNase-free», «DNase-free».

При разработке набора для выделения нуклеиновых кислот, а также для экспериментального выделения с его помощью, применялись реактивы:

- хлорид натрия, CAS номер: 7647-14-5;
- гуанидин тиоцианат, CAS номер 593-84-0;
- ЭДТА, Cas номер 60-00-4;
- Трис-HCL, CAS номер 1185-53-1;
- Твин 20, CAS номер 9005-64-5;
- HCL, CAS номер 7647-01-0;
- Triton X-100, CAS номер 9002-93-1;
- SDS, CAS номер 151-21-3;
- Глицерол, CAS номер 56-81-5;
- Изопропанол, CAS номер 67-63-0;
- Этанол, CAS номер 64-17-5
- Вода деионизированная, свободная от нуклеаз;

В рамках апробации наиболее эффективных в выделении по данному протоколу магнитных сорбентов были выбраны три коммерческих магносорбента. Различия магнитных сорбентов представлены в табл. 1.

Таблица 1

Сравнение апробируемых коммерческих магносорбентов

Показатели	Магносорбент А	Магносорбент Б	Магносорбент В
Внешний вид	Коричневая суспензия микрогранул	Тёмная водная суспензия	Тёмная водная суспензия
Краткое описание от производителя	Применяется как для выделения ДНК, так и для выделения РНК	Применяется в первую очередь для выделения небольших одноцепочечных нуклеиновых кислот	Применяется в первую очередь для выделения больших двухцепочечных нуклеиновых кислот

Дальнейшая амплификация выделенных при помощи разрабатываемого набора нуклеиновых кислот, детекция и обработка полученных результатов проводилась с помощью термоциклера Bio-Rad CFX 96, ФСЗ 2008/03399, производитель ООО «Био-Рад Лаборатории» (США) [10].

Биологический материал для проверки работоспособности разрабатываемого набора в количестве 209

штук был получен от компании INVITRO (г. Москва).

Результаты и обсуждение. Была начата разработка набора реагентов «МагнитЭК ДНК/РНК» для очистки ДНК и РНК на магнитных частицах. Для проверки эффективности выделения нуклеиновых кислот, полученные образцы ДНК были качественно и количественно исследованы методами ПЦР-диагностики в режиме реального времени; выделен-

ные образцы РНК были также качественно и количественно исследованы методами ОТ-ПЦР в режиме реального времени.

Условия проведения экстракции нуклеиновых кислот и дальнейшей ПЦР-диагностики подобраны экспериментально. В ходе разработки набора каждая составляющая и переменная (к таковым можно отнести наличие определённых этапов протокола экстракции, их длительность, величина температуры, используемые реактивы) учитывалась, корректировалась или удалялась из итогового варианта будущего набора для наилучшего варианта выделения нуклеиновых кислот.

Создание и корректировка протокола набора. В рамках разработки набора реагентов для выделения нуклеиновых кислот из клинического материала экспериментально был подобран протокол, содержащий основные этапы экстракции. Первым этапом является лизис, в котором происходит расщепление клеточных и ядерных мембран при воздействии лизирующего буфера. Следующим этапом является преципитация,

где нуклеиновые кислоты оседают при помощи раствора для осаждения и связываются с магнитным сорбентом. Дальнейший этап очистки необходим для отделения искомым веществ от примесей, происходит при участии растворов для отмывки. Заключительными шагами являются высушивание и элюирование для перехода выделенных ДНК и РНК в элюирующий раствор. Полученные нуклеиновые кислоты можно исследовать методами ПЦР-диагностики.

В ходе разработки этапы протокола неоднократно корректировались для лучших результатов выделения. К примеру, в разрабатываемый протокол вводился этап центрифугирования, но опытным путём на одних и тех же образцах было видно, что в конкретном протоколе данный этап ухудшает получаемые результаты: с центрифугированием получено меньше продуктов реакции, а также сама ПЦР дала начало на несколько циклов позже (рис. 1, а, б). Всего в представленных постановках исследовалось 10 образцов, на рисунке для лучшей визуализации показан один.

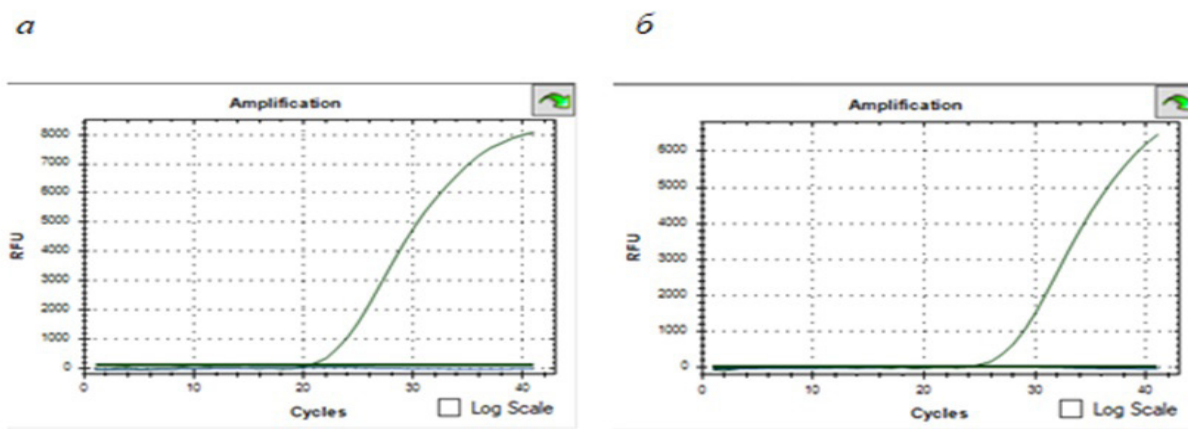


Рис. 1. Результаты сравнения вариантов разрабатываемого протокола без центрифугирования и с центрифугированием.

а – результат ПЦР выделенного ДНК конкретного образца ВГВ в протоколе без центрифугирования; б – результат ПЦР выделенного ДНК конкретного образца ВГВ в протоколе с центрифугированием.

Здесь и на рис. 2 - б: по оси абсцисс – количество циклов (Cycles), по оси ординат – уровень флуоресценции (RFU).

Также примером отличных друг от друга результатов выделения нуклеиновых кислот одинаковых образцов при корректировке протокола набора можно назвать разницу температур на этапе лизиса. Было проведено две параллельных постановки, где отличалась всего одна переменная – температура на этапе лизиса. Было исследовано 12 образцов ВГВ, результат одинаков – образцы, лизис которых проходил при 65 °С, дали более явную и сильную ПЦР чем образцы, подвергавшиеся лизису при 60 °С (рис 2). Для лучшей визуализации на рис.2 показан один образец.

Вышеназванные примеры показывают значимость даже самых малых изменений протокола, влияющих на итоговый результат экстракции нуклеиновых кислот и ПЦР.

Подбор реактивов разрабатываемого набора. За

время разработки набора для выделения были приготовлены реактивы: растворы для отмывки нуклеиновых кислот, элюирующий буфер, раствор для осаждения, а также 14 вариантов лизирующих буферов. В ходе процесса создания набора реагентов было доказано, что в первую очередь на будущий процесс выделения ДНК и РНК оказывает влияние правильный лизис клеток, в особенности действенность самого лизирующего буфера. Влияние оказывают не только наличие или отсутствие того или иного компонента буфера, но и его концентрация. К примеру, в двух данных постановках (рис.3, а, б) выделялась ДНК 10 образцов *Neisseria gonorrhoeae* по одинаковым протоколам. Различием лишь была концентрация одного из компонентов лизирующего буфера. Результат вновь отличается на несколько циклов амплификации. На рис. 3, а,б представлен один образец для лучшей визуализации. Данный пример показывает важность концентраций компонентов реактивов.

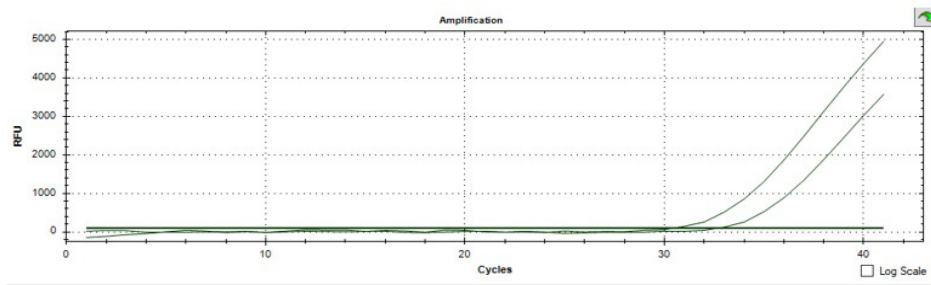


Рис. 2. Результаты сравнения вариантов температуры этапа лизиса в выделении ДНК ВГВ одного образца. Верхняя кривая – лизис проходил при 65 °С, нижняя кривая – лизис проходил при 60 °С.

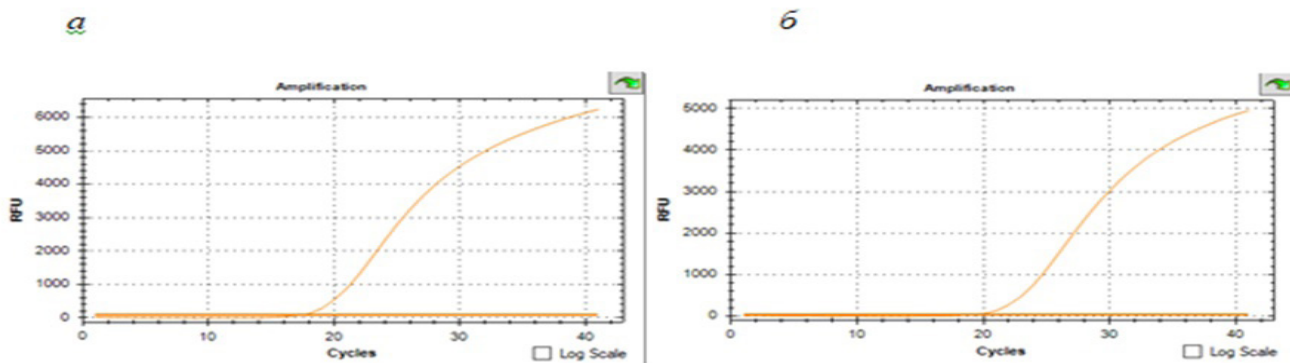


Рис. 3. Результаты сравнения различных концентраций одного компонента лизирующего буфера.

а – результат ПЦР ДНК конкретного образца *Neisseria gonorrhoeae* при большей концентрации компонента лизирующего буфера ; б – результат ПЦР ДНК конкретного образца *Neisseria gonorrhoeae* при меньшей концентрации компонента лизирующего буфера.

Подбор магнитных частиц разрабатываемого набора. В процессе создания набора реагентов апробировались три вида коммерческих магнитных частиц (см. табл. 1). Все они имели свои особенности, поэтому в процессе разработки набора необходимо было выбрать наиболее универсальный тип частиц, способный выделять как ДНК, так и РНК.

Было проведено несколько сравнительных постановок, где ДНК ВГВ и РНК ВГС выделялись при помощи разных типов магнитных частиц. В данном конкретном примере (рис.4) выделялась РНК ВГС одних и тех же образцов (где общее число образцов в процессе экстракции – 12) по одному разрабатываемому протоколу, отличием были лишь магнитные частицы. Во всех случаях наилучшая экстракция отмечалась при использовании магносорбента А. На рис. 4 представлен один образец для лучшей визуализации.

После последовательных процедур экстракции как ДНК (ВГВ), так и РНК (ВГС) был сформулирован вывод об универсальности магносорбента А. Итоговая качественная ПЦР-оценка показывает 100% выделяемость обоих классов нуклеиновых кислот при помощи магносорбента А; итоговая количественная оценка специфических продуктов реакции также наглядно показывает большую эффективность данного магносорбента. Магносорбент А был выбран для набора – он

лучше связывает не только ДНК, но и РНК, что является решающим фактором в создании универсального набора экстракции нуклеиновых кислот. Магносорбенты Б и В не столь эффективны, в особенности это касается выделения РНК, поэтому в будущем комплекте реактивов используется именно магносорбент А.

Сравнение результатов выделений ДНК и РНК разрабатываемого набора с существующими на рынке коммерческими наборами для выделения нуклеиновых кислот. Оценка работоспособности набора реагентов для выделения нуклеиновых кислот была проанализирована в сравнении с иными наборами для экстракции. Сравнение особенностей самих наборов представлено в табл. 2.

Результативность и эффективность экстракции при помощи разрабатываемого набора реагентов «МагнитЭК ДНК/РНК» и двух коммерческих наборов сравнивалась по следующим показателям:

- качественный результат выделения нуклеиновой кислоты;
- количественный результат выделения нуклеиновой кислоты;
- универсальность самого набора в выделении как ДНК так и РНК различных образцов;
- скорость постановки и получение результата.

Конкретным примером проделанной сравнитель-

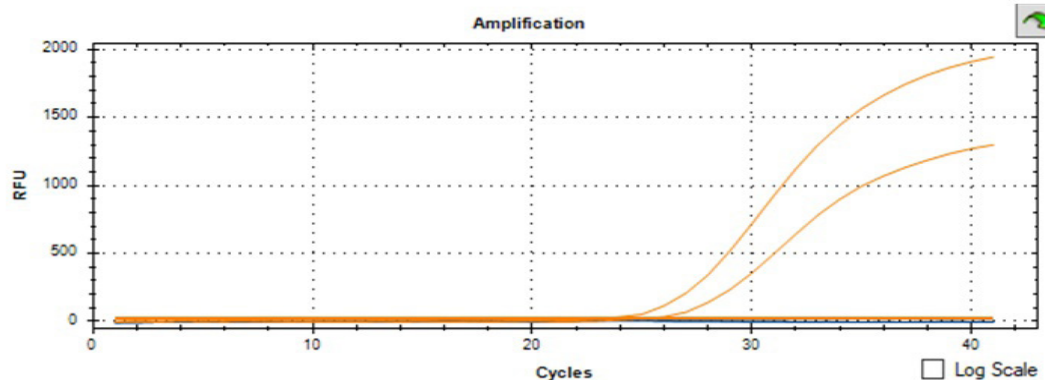


Рис. 4. Результаты сравнения эффективности магнитных частиц в выделении РНК ВГС одного образца. Верхняя кривая – результат выделения с использованием магносорбента А, нижняя кривая – результат выделения с использованием магносорбента В.

Таблица 2

Сравнение разрабатываемого набора «МагнитЭК ДНК/РНК» с коммерческими наборами, с которыми проводилось сравнение результатов выделений ДНК и РНК

Показатели	«МагнитЭК ДНК/РНК»	Коммерческий набор А	Коммерческий набор Б
Число образцов	100	100	48
Метод выделения	Магнитные частицы	Осаждение	Магнитные частицы
Использование центрифуги	Нет	Да	Да
Затраченное на выделение время, ч	2 ч	1,5-2 ч	2,5 ч и более

ной экстракции РНК может послужить выделение РНК ВГС из одних и тех же образцов при помощи разрабатываемого набора и коммерческого набора А. В представленном сравнении имелось 10 образцов, на рис. 5 представлен один для лучшей наглядности.

Качественные результаты выделений совпали во всех случаях, но количественно результаты экстракции РНК ВГС с использованием разрабатываемого набора на момент 3 квартала 2023 года отстают от коммерческого набора А.

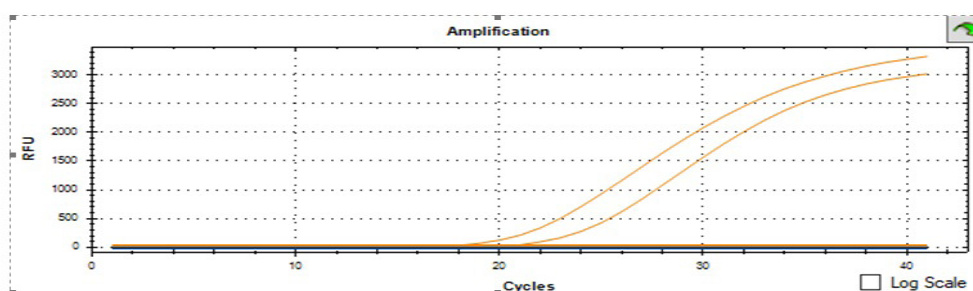


Рис. 5. Результаты сравнения эффективности экстракции РНК ВГС из одного и того же образца с использованием разрабатываемого набора и коммерческого набора А. Верхняя кривая – результат выделения с применением коммерческого набора А, нижняя кривая – результат выделения с использованием разрабатываемого набора.

Конкретным примером проделанной сравнительной экстракции ДНК может послужить выделение ДНК *Chlamydia trachomatis* из одних и тех же образцов при помощи разрабатываемого набора и коммерческого набора Б. В представленном сравнении имелось 25 образцов, на рисунке представлен один для лучшей наглядности (рис. 6, а, б). Качественные результаты выделений вновь совпали во всех случаях, количественные результаты экстракции ДНК *Chlamydia trachomatis* с использованием разрабатываемого набора на момент 3 квартала 2023 года практически идентичны коммерческому набору Б.

Экстракции нуклеиновых кислот всех трёх сравниваемых наборов, а именно выделение при помощи разрабатываемого набора «МагнитЭК ДНК/РНК» для очистки на магнитных частицах, коммерческого набора А для выделения методами преципитации и коммерческого набора Б для выделения на магнитных частицах, признаны универсальными и способными выделить как ДНК, так и РНК. По времени просчитано, что выделение нуклеиновых кислот с использованием разрабатываемого набора быстрее чем при помощи коммерческого набора Б, обладающего аналогичным методом выделения, в следствии отсутствия этапов центрифугирования.

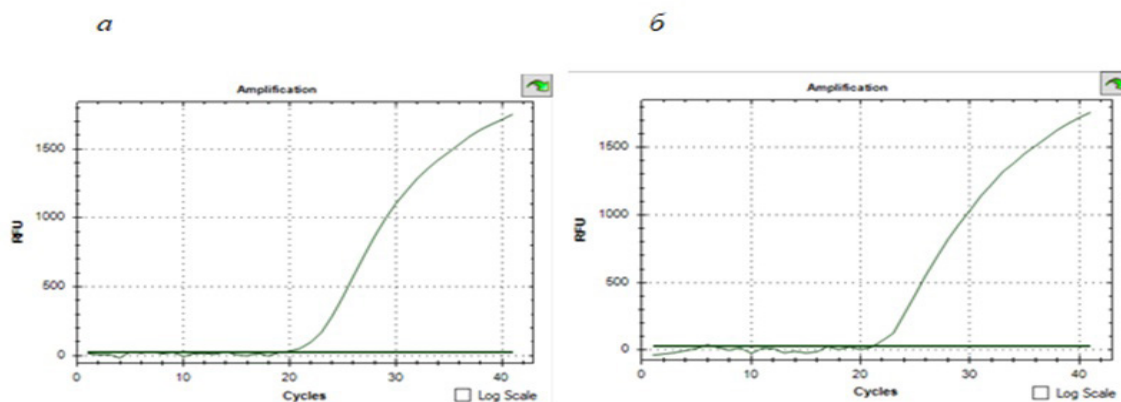


Рис. 6. Результаты сравнения эффективности экстракции ДНК *Chlamydia trachomatis* из одного и того же образца с использованием разрабатываемого набора и коммерческого набора А.

а – результат ПЦР ДНК конкретного образца *Chlamydia trachomatis*, выделенного при помощи разрабатываемого набора; б – результат ПЦР ДНК конкретного образца *Chlamydia trachomatis*, выделенного при помощи коммерческого набора Б.

Разрабатываемый набор «МагнитЭК ДНК/РНК» для очистки ДНК и РНК на магнитных частицах показал сопоставимые качественные результаты выделений ДНК и РНК для дальнейшей постановки ПЦР в реальном времени и ОТ-ПЦР в реальном времени в сравнении с иными коммерческими наборами.

На примере разработки набора реагентов «МагнитЭК ДНК/РНК» для очистки ДНК и РНК на магнитных частицах было выяснено, что каждая составляющая процесса экстракции нуклеиновых кислот (к составляющим можно отнести конкретные этапы протокола выделения, реагенты и их концентрации) непосредственно влияет на итоговый результат выделения ДНК или РНК для проведения ПЦР. При разработке подобного набора необходимо постоянно корректировать вышеназванные аспекты протокола и реативы набора для достижения лучших результатов выделения. Возвращаясь к набору «МагнитЭК ДНК/РНК», динамика разработки набора реагентов хорошая – результаты качественного анализа совпадают с иными уже существующими на рынке комплектами для экстракции. После завершения разработки набора «МагнитЭК ДНК/РНК» и выпуска он может найти своё применение в областях молекулярной диагностики инфекционных заболеваний.

Заключение. Действенный набор для выделения очень важен для проведения ПЦР-диагностики. Правильность выполнения каждого этапа выделения нуклеиновых кислот может повлиять на итоговый результат ПЦР ровно также как и один некачественный реактив. Другими словами, эффективность выделения нуклеиновых кислот напрямую связана с чувствительностью окончательных результатов теста [11]. Неправильно выделенные ДНК или РНК в свою очередь могут привести к ложноотрицательным результатам амплификации. Поэтому любой научный сотрудник или сотрудник сферы здравоохранения при амплификации нуклеиновых кислот должен учитывать не только особенности работы с термоциклером или тонкости приготовления смесей для полимеразной цепной реакции, но и предварительное каче-

ственное выделение этих самых нуклеиновых кислот при помощи наборов реагентов для выделения.

ЛИТЕРАТУРА (П.П. 5-6, 9, 11 СМ. REFERENCES)

- Орадова А.Ш. Полимеразная цепная реакция в лабораторной диагностике. *Вестник Казахского Национального медицинского университета*. 2013; 1 (4): 306-10.
- Ребриков Д.В. ПЦР в реальном времени. М.: Лаборатория знаний; 2019.
- Аукенов Н.Е., Масабаева М.Р., Хасанова У.У. Выделение и очистка нуклеиновых кислот. Состояние проблемы на современном этапе. *Наука и здравоохранение*. 2014; 1: 51-3.
- Жигалева О.Н., Ермолаев И.И., Марданлы С.Г., Гашенко Т.Ю., Помазанов В.В. Разработка набора реагентов для обнаружения РНК вируса SARS-CoV-2 в назо- и орофарингеальных мазках методом прямой полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (12): 739-43. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-12-739-743>.
- Каюмов А.Р., Гимадулдинов О.А. Практикум по молекулярной генетике. Учебно-методическое пособие. Казань: Казанский (Приволжский) федеральный университет; 2016.
- Лубенникова М.В., Афанасьев В.А., Афанасьев К.А. Выделение ДНК - важный этап молекулярно-генетического исследования. *Электронный научно-методический журнал Омского государственного аграрного университета имени П.А. Столыпина*. 2020; 21 (2): 4.
- Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения: государственный реестр медицинских изделий и организаций (индивидуальных предпринимателей), осуществляющих производство и изготовление медицинских изделий (Регистрационное удостоверение на медицинское изделие «Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000 с принадлежностями»); 2023. Режим доступа: <https://www.roszdravnadzor.gov.ru/services/misearch> (дата обращения 21 июля 2023).

REFERENCES

- Oradova A.S. Polymerase chain reaction in laboratory diagnostics. *Vestnik Kazakhskogo Natsional'nogo meditsinskogo universiteta*. 2013; 1 (4): 306-10. (in Russian)
- Rebrikov D.V. PCR in real time. Moscow: Laboratoriya znaniy; 2019. (in Russian)
- Aukenov N.E., Masabaeva M.R., Khasanova U.U. Isolation and pu-

- rification of nucleic acids. State of the problem at the present stage. *Nauka i zdavookhranenie*. 2014; 1: 51-3. (in Russian)
4. Zhigaleva O.N., Ermolaev I.I., Mardanly S.G., Gashenko T.Yu., Pomazanov V.V. Development of a kit of reagents for the detection of SARS-CoV-2 virus RNA in naso- and oropharyngeal swabs by real-time direct polymerase chain reaction. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2022; 67(12): 739-43. DOI: 10.51620/0869-2084-2022-67-12-739-743. (in Russian)
 5. Bretagne S., Costa J. M. Towards a nucleic acid-based diagnosis in clinical parasitology and mycology. *Clin. Chim. Acta*. 2006; 363(1-2): 221-8.
 6. Tan S. C., Yiap B.C. DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present. *BioMed Research International*. 2009; 2009: 1-10. DOI: 10.1155/2009/574398.
 7. Kayumov A.R., Gimadutdinov O.A. Workshop on molecular genetics. Educational-methodical manual. Kazan': Kazanskiy (Privolzhskiy) federal'nyi universitet; 2016. (in Russian)
 8. Lubennikova M.V., Afanasiev V.A., Afanasiev K.A. DNA isolation is an important stage of molecular genetic research. *Elektronnyi nauchno-metodicheskiy zhurnal Omskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta imeni P.A.Stolypina*. 2020; 21 (2): 4. (in Russian)
 9. Mancini N., Carletti S., Ghidoli N., Cichero P., Burioni R., Clementi M. The era of molecular and other non-culture-based methods in diagnosis of sepsis. *Clinical microbiology reviews*. 2010; 1(23): 235-51.
 10. Federal Service for Surveillance in Healthcare: State Register of Medical Devices and Organizations (Individual Entrepreneurs) engaged in the production and manufacture of medical devices (Registration certificate for the medical device "Thermocycler for nucleic acid amplification 1000 with accessories"); 2023. Access mode: <https://www.roszdravnadzor.gov.ru/services/misearch> (Accessed July 21, 2023).]. (in Russian)
 11. Smith K., Diggle M. A., Clarke S. C. Comparison of commercial DNA extraction kits for extraction of bacterial genomic DNA from whole-blood samples. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41 (6): 2440-3.