

Оптимизация процесса лизиса для проточного выделения нуклеиновых кислот

© М.В. Зайцева, И.Е. Антифеев, Д.Г. Петров, Н.А. Есикова, Е.Д. Макарова

Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: marishkask.mz@mail.ru

Поступило в Редакцию 19 мая 2023 г.

В окончательной редакции 26 июня 2023 г.

Принято к публикации 30 октября 2023 г.

С целью сокращения времени без потери качества выделения нуклеиновых кислот изучено влияние параметров времени и температуры химического лизиса на результаты выделения ДНК *E. coli*. Определены и обработаны значения пороговых циклов (Ct) исследуемых проб, полученных путем выделения ДНК из бактерий *E. coli* при различных параметрах лизиса: времени (5, 7, 9, 11, 13 и 15 min) и температуре (+45, +55, +65 и +75°C). Показана возможность сокращения времени лизиса на 67% (10 min) и снижения температуры для процесса лизиса клеток на 15% (10°C) без потери эффективности в сравнении с рекомендованными условиями (15 min, 65°C).

Ключевые слова: ПЦР, пробоподготовка, лизис, температура, время.

DOI: 10.61011/PJTF.2023.23.56847.176A

В настоящее время молекулярная биология является одной из наиболее актуальных областей науки. Одно из основных ее направлений состоит в исследовании нуклеиновых кислот (НК), которое имеет важное прикладное значение в таких областях, как медицина, сельское хозяйство, экология, криминалистика, фундаментальные научные исследования, и множестве других. Ввиду обширного внедрения методов молекулярной биологии в рутинных исследованиях возникает задача сокращения времени, а также финансовых и трудовых затрат на проведение анализа.

Ключевым этапом молекулярной диагностики является этап пробоподготовки [1], в частности выделение НК, от качества которого во многом зависит результат всего анализа [2,3]. Первоначальным и необходимым процессом на этапе выделения НК является лизис клеток, содержащихся в образце. В настоящее время существует множество способов разрушения клеточных стенок и мембран: механические методы (гомогенизатор высокого давления и бисерная мельница) и немеханические — физические (нагревание, осмотический шок, кавитация), химические (воздействие щелочами и детергентами) и биологические (воздействие ферментами) [4]. Среди перечисленных методов можно выделить методы химического лизиса, которые обеспечивают высокую эффективность процесса при сравнительно небольших временных и финансовых затратах [5]. Можно заметить, что эти методы подходят для любых видов клеток, так как обеспечивают выход целевого продукта как через плазматическую мембрану, так и через внешнюю мембрану и бактериальную клеточную стенку, однако они могут не обеспечить полного разрушения клетки. Для преодоления этой проблемы возможно применение комбинации механических и немеханических методов для повышения эффективности лизиса [6,7].

Быстродействие — одна из наиболее значимых характеристик диагностики, поэтому сокращение времени без потери качества выделения является ключевой задачей [8,9]. Оптимальные условия лизиса клеток могут не только позволить достичь максимальной эффективности выделения нуклеиновых кислот, минимизировать потери материала и исключить возможность загрязнения полученной НК, но и значительно сократить время выделения. Следует отметить, что особенно остро сегодня стоит задача сокращения продолжительности процесса выделения НК в условиях необходимости получения данных поточной диагностики. Помимо этого для диагностических целей необходимы универсальные оптимальные параметры лизиса в связи с тем, что эти параметры могут быть применены для различных объектов, требующих выделения НК. В частности, такие универсальные условия лизиса могут быть реализованы в автоматизированных системах выделения НК, используемых для диагностических целей.

В настоящей работе для разрушения клеток использовался широко распространенный сегодня метод химического лизиса детергентом с нагреванием. В качестве образца был выбран стандартный модельный объект — бактерия *E. coli*. Клеточная стенка бактерий усложняет процесс лизиса, поэтому при подборе оптимальных универсальных условий важно учитывать возможность ее наличия. Бактерии *E. coli* культивировали в стандартной среде Lysogeny broth (LB) при +37°C в течение 18 h. Концентрацию бактерий определяли с помощью измерения оптической плотности OD600 на спектрофотометре Implen. В качестве бланка использовалась среда LB. За рабочую концентрацию бактериальной суспензии принимали $(3.7 \pm 0.3) \cdot 10^8$ cells/ml.

Процесс выделения НК проводился с помощью коммерческого набора (ООО „СИНТОЛ“) по соответствующему набору протоколу. В лизирующий раствор вно-

Средние значения пороговых циклов Ct исследуемых образцов

Температура лизиса, °C	Время лизиса, min					
	5	7	9	11	13	15
75	17.82	17.89	17.80	17.74	17.69	17.61
65	17.33	17.32	17.24	17.44	17.31	17.31
55	17.37	17.52	17.50	17.57	17.39	17.19
45	17.96	18.22	18.10	18.27	17.92	17.72

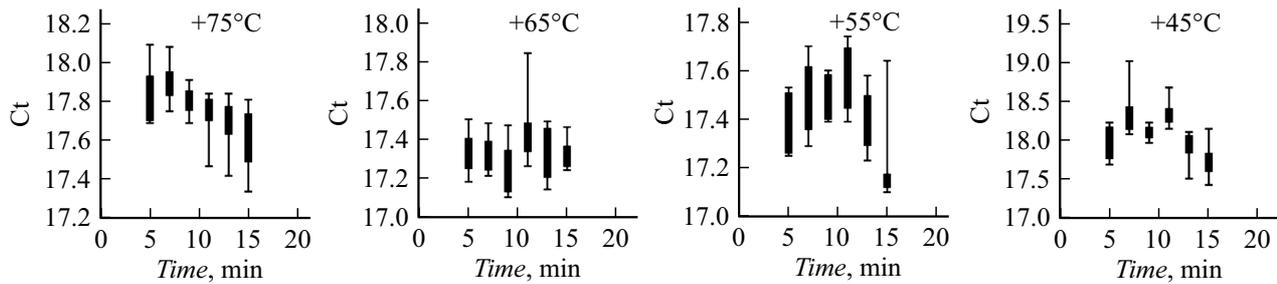


Рис. 1. Блочные диаграммы, содержащие полученные данные для пороговых циклов (Ct) температурных групп (+75, +65, +55, +45°C).

сился образец, и смесь инкубировалась в твердотельном термостате при исследуемых величинах параметров температуры и времени лизиса, при этом рекомендуемые значения данных параметров для набора составляли +65°C и 15 min соответственно. По окончании термостатирования образец охлаждался, смешивался с сорбирующим раствором магнитных частиц и осаждающим раствором, инкубировался при комнатной температуре в течение 5 min. После этапа сорбции магнитные частицы осаждались центрифугированием, затем образец помещался на магнитный штатив и удалялась надосадочная жидкость. Осадок трехкратно отмывался промывочными растворами, затем из образца полностью удалялась жидкость. Далее сорбент высушивался в течение 5 min при +65°C. Для десорбции НК к магнитным частицам добавлялся элюирующий раствор, смесь инкубировалась 10 min при +65°C. После термостатирования магнитные частицы осаждались центрифугированием, образец помещался на магнитный штатив, надосадочная жидкость, содержащая НК, отбиралась и переносилась в чистую пробирку. Для каждого параметра времени и температуры были проведены выделения НК в десяти повторах, в качестве отрицательного контроля выделения использовалась дистиллированная вода.

Эффективность лизиса при проведении процесса выделения НК оценивалась методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) с полученными образцами. ПЦР-РВ проводилась с помощью коммерческого набора (ООО „СИНТОЛ“) по соответствующему набору протоколу на приборе АНК-48 (ООО „СИНТОЛ“). Были определены значения пороговых циклов Ct исследуемых проб. Для каждого параметра времени и температуры установлено среднее

значение Ct по десяти измерениям, построены блочные диаграммы для температурных групп. Средние значения пороговых циклов Ct исследуемых проб приведены в таблице.

На рис. 1 представлены блочные диаграммы температурных групп (+75, +65, +55 и +45°C) с ограничителями выбросов, позволяющие оценить степень дисперсии данных.

Было проведено сравнение групп (десять измерений) каждого параметра времени и температуры с контрольной группой измерений, соответствующей рекомендуемым значениям параметров коммерческого набора для выделения (+65°C, 15 min). Сравнение проводилось методом непарного *t*-теста, определялись группы с достоверным отличием от контрольной группы, а также значение Ct, соответствующее порогу значимости $P = 0.05$. Полученные данные представлены в виде графиков на рис. 2.

Обработка полученных данных проводилась с помощью пакета GraphPad Prism 8.0.

В литературных источниках была показана возможность изменения температуры процесса лизиса, однако длительное нагревание может повредить структуру НК, поэтому температура выделения материала для дальнейшего анализа должна подбираться исходя из задач исследования. По итогам работы была показана возможность понижения температуры для процесса лизиса клеток на 15% (10°C) без потери эффективности в сравнении с рекомендованными условиями (65°C). При этом повышение температуры приводило к сокращению эффективности в результате повреждения НК, что полностью соответствует литературным данным.

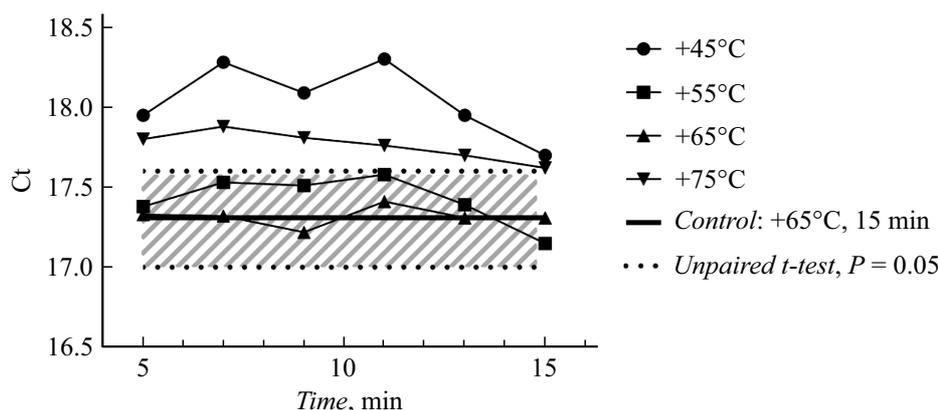


Рис. 2. Зависимости средних значений пороговых циклов (C_t) температурных групп от времени лизиса. На графике обозначено значение контрольного порогового цикла при лизисе в течение 15 min при $+65^\circ\text{C}$. Пунктиром и штриховкой выделен интервал пороговых циклов $P \leq 0.05$.

Для диагностики при массовом проведении пробоподготовки основной задачей представляется быстрота проведения стандартизованного процесса выделения на диагностическом наборе. В результате исследования была показана возможность сокращения времени лизиса при использовании коммерческого набора на 67% (10 min) без потери эффективности в сравнении с рекомендованными условиями (15 min).

Таким образом, в рамках настоящей работы найдены оптимальные условия проведения процесса выделения НК для коммерческого набора, позволяющие понизить температуру и существенно сократить время лизиса без потери эффективности.

В дальнейшем планируется продолжить изучение эффективности процесса лизиса, в частности расширить диапазоны исследуемых параметров и добавить в исследование другие модельные объекты.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] M. Karlikow, K. Pardee, in *Paper-based diagnostics*, ed. by K.J. Land (Springer, Cham, 2018), p. 171. DOI: 10.1007/978-3-319-96870-4_6
- [2] M.M. Rahman, A. Elaissari, *Drug Discov. Today*, **17** (21-22), 1199 (2012). DOI: 10.1016/j.drudis.2012.07.001
- [3] Д.Г. Петров, Е.Д. Макарова, Н.А. Корнева, А.С. Альдекеева, Н.Н. Князьков, *Науч. приборостроение*, **25** (2), 91 (2015).
- [4] I.M. Shehadul, A. Aryasomayajula, P.R. Selvaganapathy, *Micromachines*, **8** (3), 83 (2017). DOI: 10.3390/mi8030083
- [5] E. Grigorov, B. Kirov, M.B. Marinov, V. Galabov, *Micromachines*, **12** (5), 498 (2021). DOI: 10.3390/mi12050498
- [6] S.T. Harrison, *Biotechnol. Adv.*, **9** (2), 217 (1991). DOI: 10.1016/0734-9750(91)90005-g

- [7] B. Balasundaram, S. Harrison, D.G. Bracewell, *Trends Biotechnol.*, **27** (8), 477 (2009). DOI: 10.1016/j.tibtech.2009.04.004
- [8] A. Agarwal, C. Kumar, R. Goel, *Indian J. Exp. Biol.*, **39** (9), 906 (2001).
- [9] S.A. Thatcher, *Clin. Chem.*, **61** (1), 89 (2015). DOI: 10.1373/clinchem.2014.221374