

Желатиновая подложка для сбора ДНК

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

Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: yilatan_nata@mail.ru

Поступило в Редакцию 5 мая 2025 г.

В окончательной редакции 23 июня 2025 г.

Принято к публикации 23 июня 2025 г.

Показана методика создания гель-лифтера с использованием желатина, глицерина, лимонной кислоты и воды. Исследована эффективность разработанных желатиновых гель-лифтеров для сбора и последующей экстракции нуклеиновых кислот с различных поверхностей. Проведено сравнение с традиционными методами сбора ДНК, включая хлопковые тампоны и ручное выделение ДНК из образцов *E.coli*. Получена оценка влияния состава подложек гель-лифтеров на их адсорбционную способность.

Ключевые слова: гель-лифтеры, желатин, экстракция ДНК, сбор и пробоподготовка нуклеиновых кислот.

DOI: 10.61011/PJTF.2025.18.61084.8102

Сбор и пробоподготовка нуклеиновых кислот (НК) являются ключевыми этапами анализа проб на содержание генетического материала [1]. Качество и количество собранного биологического материала напрямую влияют на результаты последующих молекулярно-генетических исследований. Традиционные методы сбора ДНК с поверхности, такие как смывы, протирание тампонами, применение липких лент и гель-лифтеров, имеют свои преимущества и недостатки, обладают различной эффективностью, что требует поиска новых решений для ее повышения [2].

Гель-лифтеры представляют собой гибкие пластины на основе желатина, которые при контакте с поверхностью адсорбируют частицы, включая клетки, волосы или нуклеиновые кислоты. Они эластичны, биосовместимы и способны высвободить адсорбированный материал при лизисе. Они также не содержат ингибиторы ПЦР, такие как клей липкой ленты [3]. Желатин — биополимер, широко применяемый в медицине и фармацевтике благодаря доступности и отсутствию токсичности. Введение пластификаторов (например, глицерина) улучшает функциональные свойства желатиновых пленок [4], а добавление лимонной кислоты стабилизирует их структуру [5]. В работе [5] продемонстрировано, что пропорция компонентов — желатин : вода : глицерин : лимонная кислота — 1:2.5:1.5:0.2 обеспечивает оптимальную адгезию и термическую стабильность [5].

Основной целью работы является сравнение эффективности сбора ДНК традиционным способом и с помощью разработанной методики с использованием гель-лифтера на основе желатина, глицерина, лимонной кислоты и воды.

Для создания гель-лифтеров для сбора ДНК с поверхности использован порошковый желатин (тип А, 220 блум), глицерин как пластификатор для гибкости и лимонная кислота. Было подготовлено два варианта гель-лифтеров с различным соотношением компонентов — желатина (Ge), дистиллированной воды (H₂O),

глицерина (Gl) и лимонной кислоты (CA):

- Ge : H₂O : Gl : CA—1 : 2.5 : 1.5 : 0.2;
- Ge : H₂O : Gl : CA—1 : 6 : 3 : 0.8.

Желатин и дистиллированную воду смешивали в заданном соотношении, после чего смесь нагревали до +55 °С в течение 5 min. К гомогенизированному раствору последовательно добавляли глицерин и лимонную кислоту при непрерывном перемешивании. Полученную смесь равномерно заливали в чашку Петри, формируя слой 1 mm, и сушили при комнатной температуре в течение 48 h. Для экспериментальной оценки были вырезаны диски из полученных гель-лифтеров диаметром 9.5 mm и толщиной 1 mm (рис. 1). Для хранения они убирались в холодильник при температуре +4 °С.

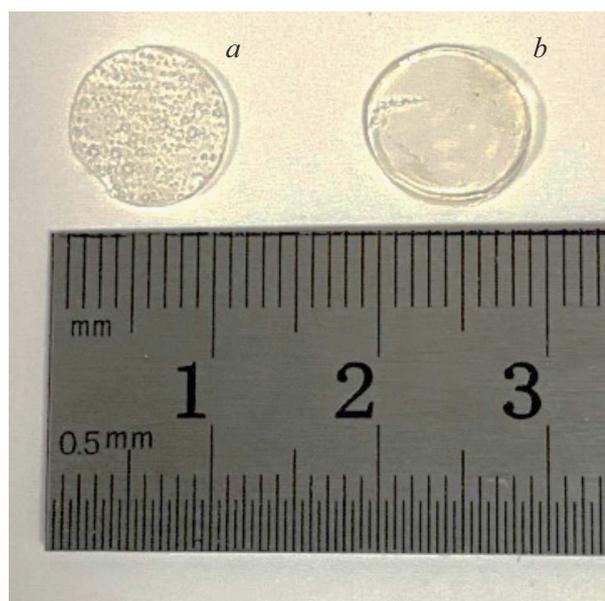


Рис. 1. *a* — гель-лифтер с соотношением компонентов 1:2.5:1.5:0.2; *b* — гель-лифтер с соотношением компонентов 1:6:3:0.8.

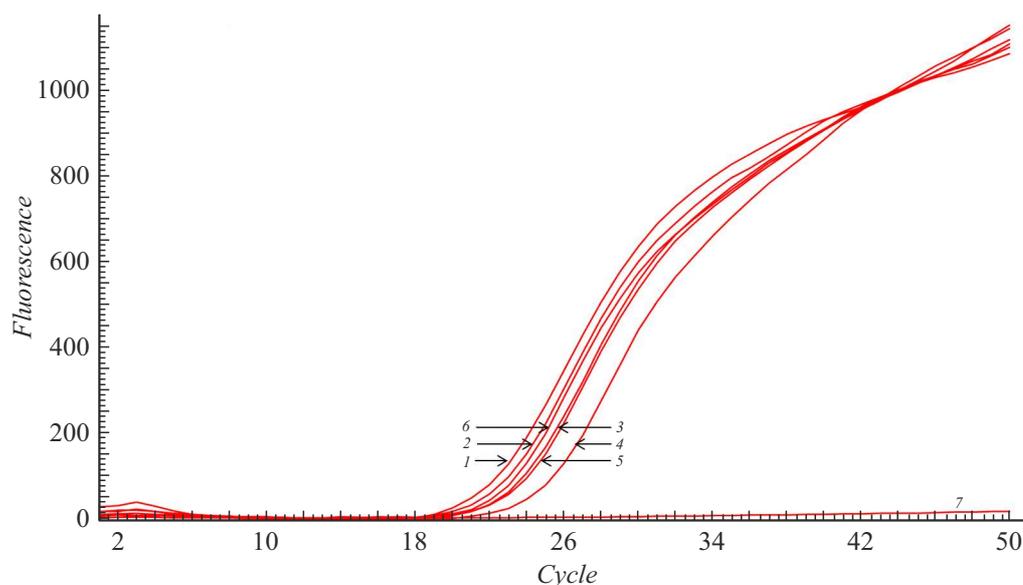


Рис. 2. Графики амплификации измерений методом ПЦР-РВ на анализаторе АНК-48. 1 — ручное выделение в пробирке; 2 — сбор хлопковым тампоном; 3 — гель-лифтер (1:2.5:1.5:0.2), сбор с сухого пятна; 4 — гель-лифтер (1:6:3:0.8), сбор с сухого пятна; 5 — гель-лифтер (1:2.5:1.5:0.2), смачивание лизирующим буфером; 6 — гель-лифтер (1:6:3:0.8), смачивание лизирующим буфером; 7 — отрицательный контрольный образец.

Эффективность сбора генетического материала исследуемым методом сравнивали с эффективностью сбора НК при помощи хлопкового тампона.

Выделение ДНК *E.coli* из гель-лифтеров проводили с использованием набора „М-Сорб-ООМ“ (ООО „Синтол“, Москва). Регистрация результатов измерений осуществлялась методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) на анализаторе АНК-48 (ИАП РАН, Санкт-Петербург).

Проведены тесты влияния на гель-лифтер лизирующего раствора и воды при различных температурах. Диск, вырезанный из гель-лифтера (9.5 mm в диаметре и 1 mm толщиной), помещали в пробирку Eppendorf, заливали 500 μ l лизирующего раствора или дистиллированной воды и помещали в термостат. Было установлено, что гель-лифтеры растворяются в лизирующем растворе без остатка при температуре выше +55 $^{\circ}$ C за 3 min при перемешивании, но нерастворимы в дистиллированной воде.

Экспериментальная оценка эффективности сбора нуклеиновых кислот с поверхности производилась с использованием пробы, содержащей генетический материал *E.coli*. Суспензия клеток *E.coli* объемом 100 μ l наносилась пипетированием на рифленую поверхность из полистирола и сушилась при комнатной температуре. Сбор ДНК из пятна пробы осуществляли несколькими способами:

1) диск из гель-лифтера (составы 1:2.5:1.5:0.2 и 1:6:3:0.8) размещали на сухом пятне, приглаживали валиком и оставляли на 10 min;

2) диск из гель-лифтера (составы 1:2.5:1.5:0.2 и 1:6:3:0.8) смачивали лизирующим буфером, размещали на сухом пятне, приглаживали валиком и оставляли на 10 min;

3) хлопковый тампон смачивали лизирующим буфером и протирали им сухое пятно.

Сбор ДНК осуществляли путем прикладывания и выравнивания подложки на поверхности, на которой находится проба, выравнивали диск валиком и оставляли на 10 min при комнатной температуре. После этого гель-лифтеры подвергали растворению, опуская в лизирующий раствор при +65 $^{\circ}$ C. Дальнейшая пробоподготовка осуществлялась одинаково по стандартной методике, рекомендованной производителем реагентов (ООО „Синтол“, Москва). Детекцию результатов проводили методом ПЦР-РВ на анализаторе АНК-48 (ИАП РАН, Санкт-Петербург).

Для каждого способа сбора ДНК с поверхности проводили по три измерения. Для наглядности на рис. 2 приведен график амплификации одного из трех повторений эксперимента, аналогичные результаты получены во всех повторениях. Цифрами 1–6 обозначены способы получения пробы, 7 — отрицательный контрольный образец.

В таблице приведены результаты выделения ДНК *E.coli* из гель-лифтеров в сравнении с собранным генетическим материалом из хлопкового тампона.

Наименьшее отставание от контрольного образца при выделении в пробирке составило 0.67 для традиционного метода сбора материала и 0.73 для сбора гель-лифтером (1:6:3:0.8), предварительно смоченным в лизирующем буфере. Также можно отметить, что смачивание лизирующим буфером существенно увеличивает эффективность

Сравнение результатов, полученных методом ПЦР-РВ для исследованных образцов

Номер образца	Описание	Средний пороговый цикл (C_t) по FAM	Разница между исследуемым образцом и выделением в пробирке (ΔC_t)
1	Ручное выделение в пробирке	21.63 ± 0.16	–
2	Сбор хлопковым тампоном	22.30 ± 0.17	0.67
3	Гель-лифтер (1:2.5:1.5:0.2), сбор с сухого пятна	23.04 ± 0.06	1.41
4	Гель-лифтер (1:6:3:0.8), сбор с сухого пятна	24.50 ± 0.15	2.87
5	Гель-лифтер (1:2.5:1.5:0.2), смачивание лизирующим буфером	23.32 ± 0.13	1.69
6	Гель-лифтер (1:6:3:0.8), смачивание лизирующим буфером	22.36 ± 0.14	0.73

методики сбора генетического материала. Помимо этого гель-лифтер с соотношением компонентов (1:6:3:0.8) получился более гладким и липким, чем гель-лифтер с соотношением компонентов (1:2.5:1.5:0.2).

Таким образом, показано, что разработанный гель-лифтер хорошо растворяется в лизирующем растворе и не растворяется в воде при комнатной температуре, что потенциально может позволить использовать данный гель-лифтер в качестве инструмента для сбора и переноса пробы.

Показана перспективность такого метода сбора ДНК, так как он позволяет эффективно собирать и переносить генетический материал с поверхности желатиновой подложки в пробу.

Смыв с поверхности является общепринятым методом сбора ДНК. Он прост в применении и не требует высоких затрат. Однако часто отмечается низкая эффективность сбора ДНК с гладких поверхностей, а также потеря материала при транспортировке без специализированных носителей. В случае сбора генетического материала с рифленых или пористых поверхностей целесообразно использовать гель-лифтеры. Экстракцию НК можно проводить, растворив желатиновый гель-лифтер в буфере.

Преимуществами гель-лифтеров являются высокая эффективность сбора ДНК, применимость для различных поверхностей, стабильность при транспортировке. Цена при этом сравнительно невысока. Предложенный в работе гель-лифтер имеет потенциал для широкого применения в различных областях медико-биологических исследований.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] Д.Г. Петров, *Разработка экспериментальной установки для создания методик автоматизированного выделения нуклеиновых кислот на твердой фазе*, канд. дис. (ИАП РАН, СПб., 2022).
- [2] Д.Г. Петров, Е.Д. Макарова, И.Е. Антифеев, М.В. Зайцева, *Науч. приборостроение*, **34** (1), 81 (2024).
- [3] С.М. Hymus, F.O. Baxter, H. Ta, T. Tran, C. de Sousa, N.S. Mountford, J.W. Tay, *Leg. Med.*, **67**, 102330 (2024). DOI: 10.1016/j.legalmed.2023.102330
- [4] N. Suderman, M.I.N. Isa, N.M. Sarbon, *Food Biosci.*, **24**, 111 (2018). DOI: 10.1016/j.fbio.2018.06.006
- [5] D. Hardman, T.G. Thuruthel, F. Iida, *NPG Asia Mater.*, **14**, 11 (2022). DOI: 10.1038/s41427-022-00357-9