

Особливості виділення ДНК зі складних зразків

Дар'я Милостива

кандидатка сільськогосподарських наук, старша наукова співробітниця, судова експертка, Дніпропетровський НДІСЕ Мін'юсту України, м. Дніпро, Україна, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3609-776x>

Анна Бабченко

кандидатка біологічних наук, старша наукова співробітниця, судова експертка, Дніпропетровський НДІСЕ Мін'юсту України, м. Дніпро, Україна, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3491-931x>

Євген Воронов

судовий експерт, Дніпропетровський НДІСЕ Мін'юсту України, м. Дніпро, Україна

Обґрунтовано вибір методу виділення ДНК зі складних біологічних зразків (старі кістки, суха кров, слина). Наголошено на необхідності у вдосконаленні методів із виділення нуклеїнових кислот з урахуванням наявних недоліків і типу аналізованого матеріалу.

Ключові слова: біологічні об'єкти: молекулярно-генетичне дослідження; нуклеїнові кислоти.

Peculiarities of DNA Extraction from Complex Samples

Daria Mylostiva, Anna Babchenko, Evgen Voronov

The paper substantiates the choice of the method for DNA extraction from complex biological samples (old bones, dry blood, saliva). The authors emphasize the importance of enhancing nucleic acid isolation methods, taking into account the existing shortcomings and the type of analyzed material.

Keywords: biological objects: molecular genetic research; nucleic acids.

Виділення ДНК із біологічних зразків є важливим етапом молекулярно-генетичного аналізу. Від якості його виконання залежить успіх наступних етапів дослідження та кінцевий результат. Тому особливого значення набуває правильний вибір методу виділення ДНК, оскільки його невірне проведення може призвести або до отримання забрудненої ДНК, непридатної для дослідження, або взагалі до втрати ДНК [1].

Нині існує безліч методів екстракції нуклеїнових кислот з різноманітного біологічного матеріалу, заснованих на різних принципах. Зокрема, для підготовки проб до аналізу полімеразної ланцюгової реакції найчастіше для виділення нуклеїнових кислот застосовують сорбційні методи, експрес-методики на основі температурного

лізису й методи на основі спиртового осадження. Однак кожен із цих підходів має як переваги, так і недоліки. Отже, необхідність у вдосконаленні методів із виділення нуклеїнових кислот з урахуванням наявних недоліків і, відповідно, типу аналізованого матеріалу не втратила своєї актуальності.

Під час роботи з ДНК, виділеної зі складних біологічних зразків (старі кістки, суха кров, слина), необхідно враховувати низку методичних проблем. До них належать занадто мала кількість та невеликі розміри фрагментів ДНК, які вдається виділити з пошкоджених зразків, а також наявність у ДНК хімічних модифікацій, що блокують її реплікацію або призводять до появи постмортальних мутацій у послідовності нуклеотидів [3].

Спонтанні пошкодження молекули ДНК у живих клітинах репаруються в процесі реплікації або призводять до загибелі та елімінації клітин. Після смерті організму репарація, як і елімінація клітин із пошкодженої ДНК, припиняється, що веде до накопичення хімічних модифікацій у молекулі ДНК та фрагментації молекул ДНК у клітинах загиблого організму. Крім цього, ДНК у похованих останках руйнується організмами ґрунтової мікробіоти. Через деградацію ДНК контамінація аналізованих зразків навіть одиничними молекулами свіжої ДНК призводить до отримання хибних результатів. Індикатором контамінації є виявлення профілю ДНК у спеціально передбаченому негативному контролі — так званий «порожній» пробі, у яку явно не вноситься ДНК, а також «змішаного», не властивого матриці профілю в позитивному контролі. Такий результат свідчить про збій у дослідженні, тому результати дослідження всієї панелі зразків визнаються недостовірними, і аналіз має бути проведено повторно [4].

Розвиток технологій екстракції та секвенування ДНК в останні роки призвів до того, що від вилучення окремих коротких фрагментів ДНК удалося перейти до визначення повної послідовності мітохондріального геному, визначення ділянок ядерного геному, до аналізу ДНК, виділених зі складних зразків.

Біологічні зразки, отримані під час дослідження криміналістичних поховань, містять дуже малу кількість ДНК, яка зазвичай сильно фрагментована. Крім цього, у ДНК, отриманих із таких зразків, наявні різного роду модифікації, що перешкоджають ампліфікації або ведуть до помилок читання нуклеотидної послідовності. Через низьку

ефективність ампліфікації автентичної ДНК, виділеної зі складних зразків біологічних субстратів, забруднення зразка навіть одиничними молекулами нової ДНК призводить до отримання хибних результатів. Унаслідок цього, для того щоб запобігти ампліфікації матриць, які не стосуються досліджуваного зразка, необхідно вживати низку спеціальних заходів, спрямованих на запобігання контамінації та виявлення результатів можливої контамінації. Хибнопозитивні результати, зумовлені внутрішньою лабораторною контамінацією, складають одну з основних проблем дослідження давньої ДНК. Тому ключовим етапом молекулярно-генетичного аналізу складних зразків є екстракція ДНК [2].

Перелік джерел посилання

1. Blozis J. Forensic DNA evidence collection at a crime scene: an investigator's commentary. *Forensic Sci Rev.* 2010; 22: 121–130.
2. Guha P, Das A, Dutta S, Chaudhuri TK. A rapid and efficient DNA extraction protocol from fresh and frozen human blood samples. *J Clin Lab Anal.* 2018;32(1):e22181. DOI: 10.1002/jcla.22181.
3. Hendrix MM, Cuthbert CD, Cordovado SK. Assessing the Performance of Dried-Blood-Spot DNA Extraction Methods in Next Generation Sequencing. *Int J Neonatal Screen.* 2020;6(2):36. DOI: 10.3390/ijns6020036.
4. Samadi Shams S, Zununi Vahed S, Soltanzad F, Kafil V, Barzegari A, Atashpaz S, Barar J. Highly effective DNA extraction method from fresh, frozen, dried and clotted blood samples. *Bioimpacts.* 2011;1(3):183-7. DOI: 10.5681/bi.2011.025.