

В. Н. Киншт, Е. Н. Воронина, М. Л. Филипенко

МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS ИЗ КЛИНИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ПЦР: СРАВНЕНИЕ И ОЦЕНКА

НИИ туберкулеза МЗ и СР РФ, Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

В условиях роста заболеваемости туберкулезом, сопровождающегося катастрофическим повышением лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза (*Mycobacterium tuberculosis*) в России [2], ранняя диагностика и эффективное лечение туберкулеза в сочетании с выявлением контактов служат необходимыми звеньями борьбы с распространением возбудителя. Для идентификации *M. tuberculosis* классическими микробиологическими методами требуется от 3 до 8 нед и еще 2—6 нед необходимо для определения лекарственной устойчивости выделенного штамма.

В конце 80-х годов прошлого столетия в арсенале исследователей появились методы, значительно сокращающие время такого анализа. Большинство из них основано на применении полимеразной цепной реакции (ПЦР) [3]. Амплификация с праймерами, специфичными к ДНК *M. tuberculosis*, используется для быстрой детекции микобактерий. Также в последние годы на основе ПЦР были разработаны удобные методы для определения мутаций, отвечающих за резистентность к лекарственным препаратам, в условиях клиники. К ним относятся, во-первых, ПДРФ-анализ амплифицированных фрагментов ДНК, включающий в себя, помимо проведения самой ПЦР, обработку полученного фрагмента эндонуклеазой рестрикции, сайт узнавания которой либо появляется, либо исчезает при наличии мутации; во-вторых, аллель-специфичная ПЦР, где один из праймеров специфичен к мутантной ДНК; в-третьих, гетеродуплексный анализ, основанный на различной электрофоретической подвижности гомологичных дуплексов (норма—норма или мутация—мутация) и гетерологичных дуплексов (норма—мутация) и др. [6].

Для проведения любого анализа, основанного на ПЦР, необходимо предварительное выделение ДНК *M. tuberculosis* из клинических образцов. Зачастую в них присутствуют минимальные количества клеток микобактерий и поэтому потери ДНК при ее выделении необходимо свести к минимуму. Также часто возникают такие трудности, как наличие ингибиторов Taq-полимеразы в образцах (гепарин, гемоглобин и др.) [9]. Даже минимальные примеси данных веществ могут приводить к ложноотрицательному результату ПЦР.

Целью настоящей работы явилась оценка нескольких доступных в клинической практике методов выделения ДНК *M. tuberculosis* из мокроты по таким критериям, как трудоемкость, стоимость и эффективность метода, а также стабильность полученного препарата ДНК.

Материалы и методы. Клинические образцы. Предпосевную обработку диагностического материала проводили согласно приложению № 14 к приказу № 558 Минздрава СССР от 8 июня 1978 г.

В качестве материала для исследования использовали мокроту пациентов с различными клиническими формами туберкулеза без бактериовыделения, находившихся в клинике Новосибирского НИИ туберкулеза. В мокроту было добавлено различ-

ное количество взвеси культуры *M. tuberculosis*, предварительно разведенной с таким расчетом, что образцы содержали соответственно 100 000, 5000 и 250 КОЕ на пробу.

Мокроту, находившуюся в стерильном флаконе с 6—8 стеклянными бусинами или с битым стеклом, заливали равным объемом 10% трехзамещенного фосфата натрия и помещали на 10 мин во встряхиватель. Затем флакон с материалом помещали на 18 ч в термостат при 37°C. Обработанный таким образом материал стерильной пипеткой объемом 5—10 мл переносили в пробирку и центрифугировали при 3000 g в течение 15 мин. При указанном режиме происходило осаждение 95% присутствовавших в материале микобактерий. Надосадочную жидкость сливали в емкость с дезинфицирующим раствором так, чтобы в пробирке остался осадок и 1,2—1,5 мл надосадочной жидкости. К раствору добавляли несколько капель 10% соляной кислоты до получения нейтрального значения pH, которое определяли индикаторной бумажной полоской. Затем добавляли 5—10 мл стерильного физиологического раствора, встряхивали и еще раз центрифугировали при 3000 g в течение 15 мин. Стерильной пипеткой отсасывали надосадочную жидкость и ресуспендировали осадок в 1 мл стерильного 0,9% раствора NaCl. Затем переносили по 0,2—0,3 мл полученной суспензии в две пробирки с различными плотными питательными средами и в микропробирку типа "Эппендорф" вместимостью 1,5 мл для дальнейшего выделения ДНК.

Выделение ДНК. С целью выделения ДНК для анализа методом ПЦР использовали следующие способы.

1. Коммерческий набор реагентов для выделения ДНК из биопроб "ДНК-экспресс", (производитель — НПФ "Литех", Москва). Согласно инструкции производителя, микропробирку с клиническим образцом центрифугировали при 12 000 об/мин в течение 5 мин, далее тщательно удаляли пипеткой надосадочную жидкость и добавляли 200 мкл реактива "ДНК-экспресс". Пробирку встряхивали на вортексе и помещали в твердотельный термостат, прогретый до 98°C, на 10 мин. После прогрева пробирку переносили в высокоскоростную микроцентрифугу и центрифугировали при 12 000 об/мин в течение 1 мин. Супернатант использовали в качестве источника ДНК для постановки амплификации.

2. Коммерческий набор реагентов для выделения ДНК из биопроб "ДНК-сорб-В" (производитель — фирма "Амплисенс", Москва). Согласно инструкции производителя к клеточному осадку добавляли 300 мкл лизирующего раствора, тщательно перемешивали на вортексе, прогревали 5 мин при 65°C, перемешивали на вортексе и добавляли по 25 мкл ресуспендированного сорбента. Затем тщательно перемешивали, ставили в штатив на 2—3 мин для полного осаждения сорбента, повторно встряхивали на вортексе и отстаивали еще 4—5 мин. Сорбент осаждали в пробирках на микроцентрифуге при 10 000 об/мин в течение 30 с. Отбирали супернатант из каждой пробирки и к осадку добавляли по 300 мкл отмывочного раствора № 1, переме-

шивали на вортке до полного ресуспендирования сорбента, осаждали на микроцентрифуге в течение 30 с при 10 000 об/мин. Снова отбирали супернатант вакуумным отсосом, добавляли по 500 мкл отмывочного раствора № 2, перемешивали на вортке до полного ресуспендирования сорбента, вновь осаживали на микроцентрифуге в прежнем режиме. Отмывку раствором № 2 повторяли, тщательно отбирали супернатант, подсушивали осадок сорбента в пробирках с открытой крышкой, используя термостат для микропробирок, в течение 5—6 мин. После высыхания сорбента его ресуспендировали в 50 мкл элюирующего буфера, помещали в микротермостат при 65°C на 5 мин, периодически встряхивая на вортке. Осаждали сорбент на микроцентрифуге при максимальных оборотах (15 000—16 000 об/мин) в течение 1 мин. Супернатант, содержащий очищенную ДНК, вносили в реакционную смесь для постановки ПЦР.

3. Метод фенол-хлороформной экстракции (ФХЭ) с предварительной обработкой протеиназой К. Клеточный осадок ресуспендировали в 300 мкл раствора № 1 (100 мМ трис-НСl pH 8,0, 10 мМ ЭДТА, 2 мг/мл лизоцима) и инкубировали 60 мин при 37°C. Добавляли 50 мкл раствора № 2 (8% додецилсульфат натрия (SDS)) и 50 мкл протеиназы К (2 мг/мл). Хорошо перемешивали и инкубировали при 42°C 60 мин. Затем добавляли 200 мкл фенола и 200 мкл хлороформа, интенсивно перемешивали и центрифугировали 10 мин при 12 000 об/мин. Верхнюю фазу переносили в чистую пробирку, не затрагивая нижнюю фазу и интерфазу. Проводили повторную экстракцию 400 мкл хлороформа. К водной фазе добавляли 10 мкл ЛПААГ, 40 мкл 3М ацетата натрия (pH 5,4) и 800 мкл 96% этилового спирта, тщательно перемешивали. Инкубировали в течение ночи при -20°C. ДНК осаждали центрифугированием 15 мин при 12 000 об/мин. Осадок промывали 400 мкл 75% этилового спирта, сушили при 37°C в течение 15 мин и растворяли в 30 мкл воды.

4. Метод ФХЭ с гуанидином. К клеточному осадку добавляли 250 мкл лизирующего буфера (6 М GuHCl, 40 мМ трис-НСl pH 6,4, 36 мМ ЭДТА) и тщательно перемешивали. Смесь прогревали 5 мин при 65°C и добавляли 125 мкл фенола и 125 мкл хлороформа. Далее выделяли так же, как и при ФХЭ с протеиназой К.

5. Метод сорбции ДНК на силикагеле. В пробирку емкостью 1,5 мл с клиническими образцами вносили по 250 мкл лизирующего раствора (6 М GuHCl, 40 мМ трис-НСl pH 6,4, 36 мМ ЭДТА) и тщательно перемешивали на вортке. Прогревали пробирку 5 мин при 65°C, тщательно перемешивали на вортке до полного растворения материала. Добавляли 20 мкл ресуспендированного на вортке сорбента (Silica S-5631, "Sigma"), хорошо перемешивали и отстаивали 7—9 мин. Сорбент осаждали на микроцентрифуге в течение 30 с. Отбирали супернатант и добавляли по 400 мкл отмывочного раствора (4 М GuHCl, 40 мМ трис-НСl pH 6,4), перемешивали на вортке до полного ресуспендирования сорбента, осаждали на микроцентрифуге в течение 30 с и отбирали супернатант. Повторяли процедуру отмывки еще раз. Осадок промывали 70% этиловым спиртом и высушивали в термостате при 56°C в течение 10 мин. Добавляли 100 мкл элюирующего буфера (80 мМ NaOH, 0,5 мМ ЭДТА), тщательно ресуспендировали и помещали в термостат при 56°C на 10 мин, затем добавляли 5,3 мкл раствора 1 М трис-НСl pH 6,4 и встряхивали на вортке. Суспензию осаждали на микроцентрифуге при 10 000 об/мин в течение 1 мин. Супернатант со держал очищенную ДНК.

6. Метод щелочного кипячения. К клеточному осадку добавляли 100 мкл раствора, содержащего 1 М NaOH и 2% тритон X-100. Пробирку прогревали 5 мин при 100°C (на водяной бане). Затем добавляли 100 мкл раствора, содержащего 1 М трис-НСl pH < 6,0, и 20 мкл хлороформа. Центрифугировали образцы в течение 3 мин при 12 000 об/мин. Супернатант переносили в новую пробирку и добавляли 10 мкл ЛПААГ и 600 мкл этилового спирта. Инкубировали в течение ночи при -20°C. ДНК осаждали центрифугированием в течение 15 мин при 12 000 об/мин и промывали 400 мкл 75% этилового спирта. Осадок высушивали при 37°C в течение 15 мин, после чего растворяли в 30 мкл воды.

Конкурентная ПЦР. Конкурентные стандартные ДНК для определения количества ДНК *M. tuberculosis* были получены путем амплификации геномной ДНК фага T4 с праймерами, специфичными для последовательности гена ESAT6 *M. tuberculosis*, с использованием низкой температуры отжига на первых циклах [1]. Нуклеотидная последовательность праймеров: ESAT6-U: 5'-GCACCATGGCAGAGCAGCATGGGA-3'; ESAT6-R: 5'-

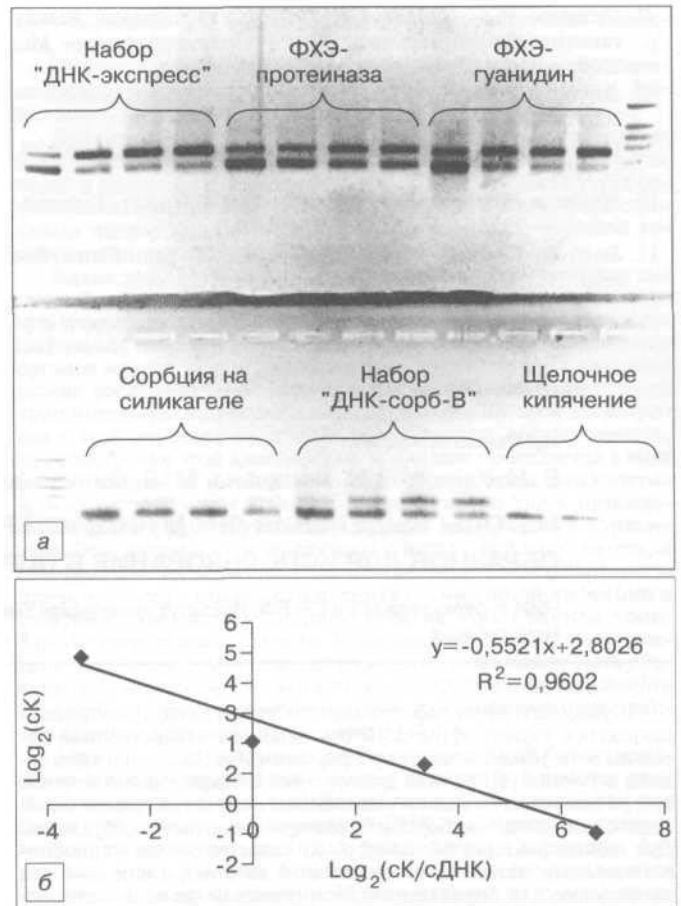


Рис. 1. Определение количества выделенной ДНК *M. tuberculosis* с помощью конкурентной ПЦР.

а — электрофореграмма анализа конкурентной ПЦР ДНК *M. tuberculosis*, выделенной различными методами; б — график линейной регрессии: по оси абсцисс — логарифм начальных концентраций конкурентной ДНК, в которых она добавлялась в ПЦР (R — коэффициент аппроксимации); по оси ординат — логарифм отношения количества конкурентной ДНК (сК) к количеству исследуемой ДНК (сДНК).

GCATCTAGACTATGCGAACATCCCAGTGA-3' (синтезированы в ИХБФМ СО РАН). Для получения стандартных ДНК ПЦР проводили в объеме 20 мкл в следующих режимах: 95°C — 3 мин, 37°C - 2 мин, 72°C — 1 мин, 94°C - 1 мин, 37°C — 2 мин, 72°C

— 1 мин, затем 37 циклов: 94°C — 1 мин, 60°C — 0,5 мин, 72°C — 1 мин. Использовали ДНК-амплификатор фирмы "Eppendorf" (Германия). После электрофоретического разделения амплификационных смесей вырезали фрагменты нужной длины, синтезирующиеся с двух праймеров, и реамплифицировали их. Концентрации стандартной ДНК, при которых наблюдалась конкуренция с исследуемой ДНК *M. tuberculosis*, определяли путем подбора в амплификациях с различными концентрациями конкурента и постоянным количеством ДНК. Реакционная смесь для конкурентной ПЦР общим объемом 10 мкл содержала 1 мкл ДНК *M. tuberculosis*, 1 мкл ДНК конкурента нужной концентрации, 1 мкМ каждого праймера, 1 ед. активности Taq-полимеразы, 0,2 мМ раствор dNTP в стандартном буфере, содержащем 67 мМ трис-НСl (pH 8,9), 16 мМ сульфат аммония, 1,5 мМ MgCl₂, 0,05% твина-20. Условия проведения ПЦР: 1-й цикл: 95°C — 2 мин, 60°C — 0,4 мин, 72°C — 0,7 мин; затем 36 циклов:

94°C — 0,7 мин, 60°C - 0,4 мин, 72°C — 0,7 мин. Количество циклов подбирали так, чтобы остановить реакцию через 2 цикла после выхода на плато. По окончании ПЦР продукты амплификации анализировали с помощью электрофореза в 1,5% агарозном геле, гель окрашивали бромистым этидием, визуализировали ДНК под УФ-светом. Изображение отцифровывали, используя цифровую видеокамеру "Vatec" (Япония) и рассчитывали количество ДНК по плотности полос с помощью программы "ScionImage" [http://www.scioncorp.com]. Строили график ли-

Сравнение методов выделения ДНК *M. tuberculosis* из клинических образцов

Метод	Количество ДНК, выделенной из 10^5 КОЕ, пг (\pm S. E.)	Минимальное количество материала для выделения более 0,1 пг ДНК, КОЕ	Трудозатраты, мин		Стоимость одного выделения, руб.
			время непосредственной работы с образцом	общее время (без учета времени ночной инкубации с этанолом)	
Набор "ДНК-экспресс"	$3,0 \pm 0,25$	200	5	20	~7
Набор "ДНК-сорб-В"	$1,0 \pm 0,25$	10^4	20	50	~12
Щелочное кипячение	$< 0,1$	$> 10^5$	20	50	~1
Фенолхлороформная экстракция с гуанидином	$6,0 \pm 3,1$	10	50	100	~15
Фенолхлороформная экстракция с протеиназой	$1,0 \pm 0,08$	200	60	225	~15
Сорбция на силикагеле	$0,2 \pm 0,15$	10^5	50	90	~10

Примечание. S. E. — стандартное отклонение.

нейной регрессии, откладывая по оси ординат логарифм отношения количества конкурентной ДНК к количеству исследуемой ДНК *M. tuberculosis*, а по оси абсцисс — логарифм начальных концентраций конкурентной ДНК, в которых она добавлялась в ПЦР. Определяли точку эквивалентности, в которой логарифм отношения количества конкурентной ДНК к количеству ДНК *M. tuberculosis* был равен 0, а изначальное количество исследуемой ДНК *M. tuberculosis* соответствовало количеству конкурентной ДНК (рис. 1, б). По результатам 3 повторных измерений для каждого выделения ДНК *M. tuberculosis* рассчитывали среднее значение, а также стандартное отклонение.

Результаты и обсуждение. Для оценки количества ДНК *M. tuberculosis*, выделенной разными методами из образцов, содержащих 10^5 КОЕ, применяли метод полуколичественной конкурентной ПЦР [8]. На рис. 1, а приведена электрофореграмма такого анализа. Данные о количестве выделенной ДНК, приведенные в таблице, показывают, что наибольшее количество ДНК было получено с помощью набора "ДНК-экспресс" и при ФХЭ с использованием в качестве лизирующего буфера гуанидин-гидрохлорида. Затем следует ФХЭ с использованием протеиназы К. Еще меньшее количество ДНК выделено при использовании набора "ДНК-сорб-В-30" и сорбции на силикагеле. В то же время при выделении ДНК с помощью щелочного кипячения она не определялась вообще в исследуемом диапазоне концентрации конкурента.

Количество ДНК, выделяемой из клинического образца, зависит от количества инфекционного агента. Однако при каком-то минимальном количестве бактерий ДНК не будет выделяться из-за неизбежных потерь в процессе выделения. Таким образом, низкая чувствительность метода может привести к появлению ложноотрицательных результатов [4]. Для определения чувствительности методов мы использовали последовательное разведение клинических образцов в 20 раз с дальнейшим выделением ДНК *M. tuberculosis* и оценкой количества выделенной ДНК методом конкурентной ПЦР (рис. 2, а). По полученным данным строили график отношения количества выделенной ДНК к количеству бактерий в образце. График на рис. 2, б показывает, что при использовании набора "ДНК-сорб-В" количество полученной ДНК падало более резко при разведении клинического образца, чем при других методах. Это свидетельствует о больших потерях в процессе выделения ДНК. Схожая тенденция наблюдалась при выделении ДНК на силикагеле, на основании чего можно предположить, что данные потери обусловлены необратимой сорбцией определенной части ДНК на силикагеле. Схожие данные были получены в нашей лаборатории при выделении ДНК вируса гепатита В методом сорбции на силикагеле, где добавление ДНК печени крысы увеличивало выход вирусной ДНК и улучшало стабильность выделения, вероятно, за счет "забивания" мест необратимого связывания.

Для определения стабильности полученных ДНК *M. tuberculosis* использовали два теста. В первом их инкубировали в течение 72 ч при 37°C , а во втором выдерживали при -20°C в течение 2 мес. Затем количество ДНК оценивали методом конкурентной ПЦР и сравнивали с предыдущими данными. Значительных изменений в количестве ДНК нигде не наблюдалось (данные не приведены).

Данные о количестве выделенной ДНК, количестве бактерий для выделения более 0,1 пг ДНК, стоимости и трудозатратах приведены в таблице.

В нашем исследовании мы сравнили несколько способов выделения ДНК *M. tuberculosis* из клинических образцов. Начальные условия были одинаковыми для всех методов, так как выделение проводилось из одного образца, разделенного на 6

равных частей. Для того чтобы свести к минимуму ошибку при наборе материала, исследование повторяли 3 раза и за количество ДНК принимали среднее значение. Наибольшее количество ДНК выделяется с помощью ФХЭ с гуанидином и набором фирмы "Литех". По чувствительности ФХЭ превосходит набор

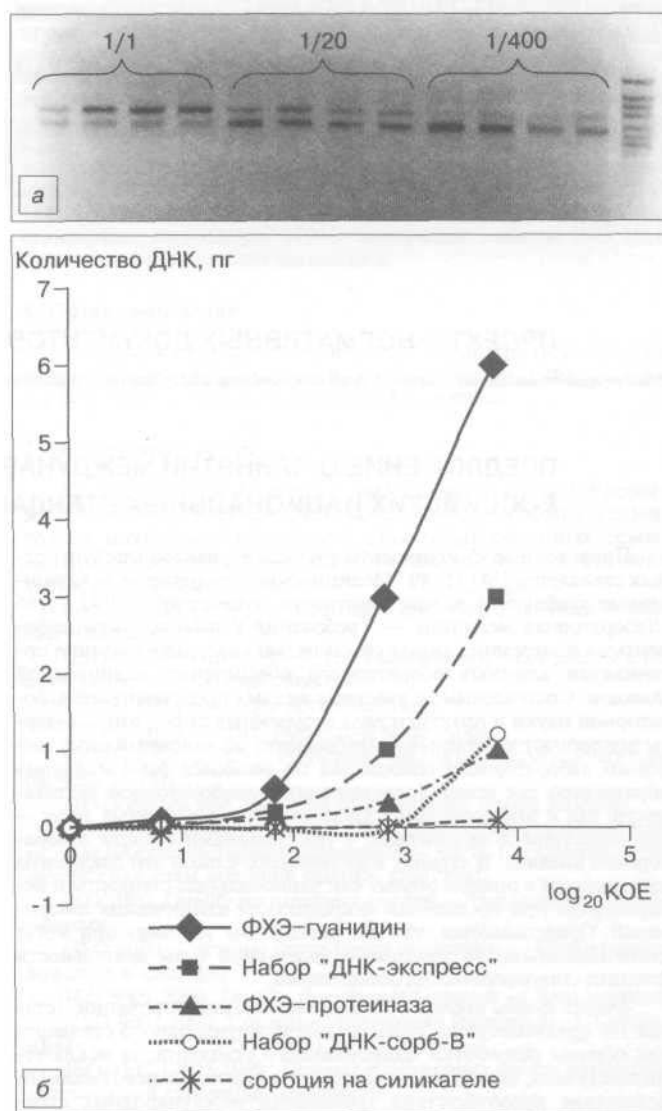


Рис. 2. Определение чувствительности методов выделения ДНК *M. tuberculosis*.

а — электрофореграмма анализа конкурентной ПЦР ДНК *M. tuberculosis*, выделенной методом ФХЭ из клинических образцов с последовательным разведением в 20 раз; б — график отношения количества выделенной ДНК к количеству материала, взятого в анализ (\log_{20} КОЕ).

"ДНК-Экспресс", однако трудозатраты и стоимость набора значительно ниже, чем при ФХЭ. Методы, основанные на ФХЭ, дают хороший выход ДНК, но очень трудоемки. Еще одним отрицательным фактором в них является токсичность фенола и хлороформа, что требует наличия вытяжного шкафа в лаборатории, где эти методы применяются.

Щелочное кипячение зарекомендовало себя как очень удобный и простой способ для выделения ДНК из культур бактерий. Некоторые исследователи применяли его также при выделении ДНК из клинических образцов [5]. Однако наши данные свидетельствуют о малом количестве выделяемой ДНК и соответственно о низкой чувствительности данного метода, что может приводить к большому количеству ложноотрицательных результатов. Этого можно избежать, увеличивая количество циклов при проведении амплификации. На данный момент необходимо обратить внимание исследователям, пользующимся этим методом.

Набор "ДНК-сорб-В" фирмы "Амплисенс", основанный на применении силикагеля, дал средние результаты по количеству выделенной ДНК. Но чувствительность метода ниже, чем у остальных. Ранее было показано, что выделение на силикагеле с лизисным буфером на основе гуанидин-изотиоцианата приводит к ингибированию ПЦР-реакции [7]. Однако наши данные указывают на значительные потери ДНК в процессе выделения (возможно, за счет частичной сорбции ДНК на силикагеле), что и приводит к уменьшению чувствительности метода.

Таким образом, наиболее эффективным методом выделения ДНК из клинических образцов можно признать коммерческий набор "ДНК-экспресс" фирмы "Литех".

Работа поддержана грантом МНТЦ № 1980 и грантом РАН "Фундаментальные науки — медицине".

ЛИТЕРАТУРА

1. Carrasco C, Esteban O., Domingo A. // *Anal. Biochem.* 1997. — Vol. 244. - P. 406—407.

2. Cohn D. L., Flava B., Raviglione M. C. // *Clin. Infect. Dis.* — 1997. - Vol. 24. - P. 121-130.
3. Mullis K. B., Faloona F. A. // *Meth. Enzymol.* - 1987. - Vol. 155. — P. 335—350.
4. Noordhoek G. T., van Embden J. D. A., Kolk A. J. J. // *J. Clin. Microbiol.* — 1996. — Vol. 34. — P. 2522—2525.
5. Hinder H., Mieskes K. T., Tortoli E. et al. // *Mol. Cell. Probes.* - 2001. - Vol. 15. - P. 37-42.
6. Rolf A., Schuller I., Finckh U., Weber-Rolfs I. *PCR: Clinical Diagnostics and Research.* — Berlin; Heidelberg, 1992.
7. Suffls P., Vanderborgh P. R., dos Santos P. B. et al. // *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* - 2001. - Vol. 96. - P. 1137-1139.
8. Wang A., Doyle M., Mark D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1989. - Vol. 86. - P. 9717-9721.
9. Wilson I. G. // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1997. — Vol. 63. - P. 3741-3751.

Поступила 10.02.04

METHODS OF EXTRACTION OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS DNA FROM CLINICAL SAMPLES FOR PCR: COMPARISON AND EVALUATION.

V.N. Kinsht, E.N. Voroni-na, M.L. Philipenko

Several commonly used methods of extraction of *Mycobacterium tuberculosis* DNA from clinical samples for further use in PCR were compared. We used the commercial sets "DNA-express" (Litekli, Russia) and "DNA-sorb-B" (Amplisens, Russia) as well as phenol extraction, fast alkaline lysis and DNA sorption on silicone gel for DNA extraction. All methods were compared by the quantity of isolated DNA and stability of DNA preparation as well as by efficiency and cost of extraction. "DNA-express" proved to be most effective in the extraction of *Mycobacterium tuberculosis* DNA with its cost being the smallest.