



УДК 577.29

Оценка эффективности экстракции мтДНК из лейкоцитомембранного слоя крови человека

© 2021 Дворецкая Ю.Д.^{1,2}, Грязнова М.В.^{1,2}, Сыромятников М.Ю.^{1,2}, Сержантова О.В.³, Михайлов А.А.³, Мошуров И.П.³, Попов В.Н.^{1,2}

¹Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж

²Воронежский государственный университет, Воронеж

³БУЗ ВО «Воронежский областной клинический онкологический диспансер», Воронеж

Поступила в редакцию 21.09.2021 г.

DOI: 10.17308/sorpchrom.2021.21/3838

Митохондриальная ДНК (мтДНК) широко используется в различного рода исследованиях, так как изменения в мтДНК (мутации или крупномасштабные делеции) могут вызывать широкий спектр заболеваний, таких как диабет, сердечные дисфункции, различные формы рака и т.д. Выделение и количественная оценка мтДНК часто требуются для изучения вклада мтДНК в развитие патологий. Однако выделение достаточного количества мтДНК по-прежнему остается трудной задачей.

Целью данного исследования была оценка и сравнение трех методов экстракции мтДНК из лейкоцитомембранного слоя крови человека. В основе всех выбранных нами наборов для выделения ДНК лежит метод сорбционной экстракции, принцип которой заключается в особых свойствах носителей на основе кремния для селективного связывания ДНК. Также оценивалось влияние двух широко используемых типов антикоагулянтов на эффективность экстракции мтДНК.

Посредством систематического сравнения методов выделения мтДНК мы определили процедуру, обеспечивающую наибольший выход мтДНК, которая, как мы показываем, демонстрирует высокую производительность в последующих анализах.

Для экстракции мтДНК были взяты образцы лейкоцитомембранного слоя крови у 12 добровольцев и использовались три различных протокола выделения (Quick-DNA MiniPrep Plus (Zymo Research, США), Plasmid miniPrep (Evrogen, Россия) и набор QIAamp® Blood Mini Kit (QIAGEN, Германия)). Далее проводилась оценка количества ДНК с помощью флуориметрии и количественной полимеразной цепной реакции.

Полученные результаты показали, что из исследуемых методов выделения ДНК, экстрагированная с помощью набора QIAamp® Blood Mini Kit (QIAGEN, Германия), который основан на применении колонок с силикагелевой мембраной, дает оптимальную концентрацию мтДНК. Разницы между количествами мтДНК, выделенными из крови с различными антикоагулянтами обнаружено не было. Наши результаты подчеркивают важность выбора метода изоляции мтДНК, так как этот этап является определяющим для получения высококачественной мтДНК, которая будет пригодна для дальнейших молекулярно-генетических исследований.

Ключевые слова: митохондриальная ДНК, qPCR, флуориметрия, выделение ДНК.

Введение

Митохондрии — это внутриклеточные органеллы, участвующие в производстве энергии в процессе окислительного фосфорилирования, которые имеют собственный геном (мтДНК), отличный от

генома в ядре клетки (ядДНК). Хотя митохондриальная масса на клетку варьируется в зависимости от типа клетки и состояния метаболизма, каждый тип клеток обычно содержит довольно постоянное количество митохондрий и, соответственно, количество копий митохондри-

ального генома также постоянно, поскольку оно связано с митохондриальной массой [1]. Каждая митохондрия содержит от 2 до 10 копий своего генома [2].

Уменьшение, либо увеличение биогенеза митохондрий в клетках могут быть маркерами первичной митохондриальной патологии или системной патологии, которая влияет на биологию митохондрий. Хотя мтДНК можно изучать в любой ткани, кровь является одной из наиболее часто используемых, поскольку образцы могут быть легко получены. Изменения мтДНК в крови могут быть связаны с первичными митохондриальными нарушениями [3,4], которые иногда связаны с первичными генетическими мутациями [5,6], но также связаны с сердечной дисфункцией [7], канцерогенезом и прогрессированием рака [8,9], ВИЧ-инфекцией [10], диабетом [11-13] и микроальбуминурией [14]. Мутации в мтДНК относительно распространены, по крайней мере, у 1 из 200 здоровых людей имеется потенциально патогенная мутация мтДНК [15]. Действительно, более 300 точечных мутаций в мтДНК связаны с риском заболевания и патологией согласно базе данных митохондриального генома человека MitoMAP [16].

В данной работе мы проводим сравнение эффективности выделения мтДНК тремя различными методами путем одновременной экстракции яДНК и мтДНК из лейкоцитомембранного слоя крови человека с последующим использованием количественной ПЦР в реальном времени (qPCR). В настоящее время, qPCR является подходящим методом для количественного определения мтДНК [17-19]. В основе всех трех используемых коммерческих наборов для выделения ДНК лежит метод сорбционной экстракции, принцип которой заключается в уникальных свойствах носителей на основе кремния для селективного связывания ДНК. За счет высокой афинности отрицательно заряженного остова ДНК к положительно заряженным силикатным частицам про-

исходит связывание ДНК с неорганическим носителем, с последующими этапами отмывки от примесей и элюцией очищенного продукта [20-23]. Набор Quick-DNA Miniprep Plus (Zymo Research, США) содержит сорбционные колонки Zymo-Spin™, благодаря которым не происходит переноса буферов, солей или ингибиторов ПЦР. Элюированная ДНК готова для всех чувствительных последующих применений, включая qPCR, секвенирование следующего поколения и анализ метилирования. Выделение ДНК с помощью набора Plasmid miniPrep (Evrogen, Россия) основано на применении микроцентрифужных колонок с сорбционными стекловолкнистыми мембранами. Набор QIAamp® Blood Mini Kit (QIAGEN, Германия) обеспечивает специфическое связывание ДНК с силикагелевой мембраной QIAamp. Содержание соли и уровень pH в лизате гарантируют, что белок и другие загрязнители, которые могут ингибировать ПЦР и последующие ферментативные реакции, не удерживаются на мембране QIAamp. Также в исследовании проводили оценку влияния двух широко используемых антикоагулянтов (цитрат натрия и ЭДТА-к3) на эффективность выделения ДНК.

Целью данной работы было сравнение эффективности трех имеющихся в продаже коммерческих наборов, действие которых основано на сорбировании нуклеиновых кислот, для выделения ДНК.

Экспериментальная часть

Этическое согласие. Образцы крови были отобраны среди здоровых пациентов Воронежского областного клинического онкологического диспансера. Во всех случаях было получено информированное согласие, пациенты были проинформированы о том, что с их биологическим материалом будут проводиться генетические исследования.

Образцы. Образцы цельной крови были взяты от 12 условно здоровых пациентов, чей общий анализ крови находился

в пределах референсных значений. Образцы собирали в пробирки с EDTA-K3 на 1.6 мл (BD Vacutainer) и в пробирки с цитратом натрия 4.5 см³ (BD Vacutainer), после чего центрифугировали при комнатной температуре в течение 10 мин при 2500 об/мин для получения лейкоцитарного слоя. Затем из каждого образца крови отбирали 3 аликвоты по 100 мкл в отдельные пробирки и добавляли по 100 мкл хлорида натрия 0.9%. После чего приступали к выделению ДНК.

Выделение ДНК. 1. Набор Quick -DNA Miniprep Plus (Zymo Research, США). К исследуемому образцу добавляли 200 мкл BioFluid & Cell Buffer и 20 мкл Proteinase K. Вручную тщательно перемешивали образец, затем инкубировали 10 минут при 55°C. Затем добавляли 420 мкл Genomic Binding Buffer, тщательно перемешивали вручную, переносили смесь в Zymo-Spin™ ПС-XLR Column, помещенную в собирающую пробирку. Центрифугировали 1 минуту на скорости 12000 g. Выбрасывали собирающую пробирку с фильтратом, помещали Zymo-Spin™ ПС-XLR Column в новую собирающую пробирку и добавляли 400 мкл DNA Pre-Wash Buffer, центрифугировали 1 минуту на скорости 12000 g. Удаляли фильтрат из собирающей пробирки, добавляли 700 мкл g-DNA Wash Buffer в спин-колонку, центрифугировали 1 минуту на скорости 12000 g. Избавлялись от фильтрата из собирающей пробирки, добавляли 200 мкл g-DNA Wash Buffer в спин-колонку, центрифугировали 1 минуту на скорости 12000 g. Выбрасывали собирающую пробирку с фильтратом, переносили спин-колонку в чистую 1.5 см³ пробирку. Добавляли 50 мкл DNA Elution Buffer непосредственно на мембрану колонки, инкубировали 5 минут при комнатной температуре, затем центрифугировали 1 минуту на скорости 20000 g для элюирования ДНК.

2. Набор Plasmid miniPrep (Evrogen, Россия). К исследуемому образцу добавляли 20 мкл Proteinase K, тщательно перемешивали и инкубировали 10 минут при

55°C, после чего добавляли 250 мкл лизирующего раствора, затем осторожно перемешивали вручную и инкубировали 1 минуту при комнатной температуре. Далее вносили 350 мкл нейтрализующего раствора, полученную смесь перемешивали вручную и инкубировали 1 минуту при комнатной температуре, после чего центрифугировали 10 минут при 13000 g. Супернатант переносили в спин-колонку, помещенную в собирающую пробирку, затем центрифугировали 30 секунд при 13000 g. Фильтрат из собирающей пробирки удаляли, вносили 700 мкл промывочного раствора, центрифугировали 30 секунд при 13000 g, затем колонку центрифугировали повторно для удаления остатков промывочного раствора, удаляли фильтрат. Колонку помещали в новую пробирку (1.5 мл), в центр мембраны колонки наносили 50 мкл элюирующего раствора, инкубировали 5 минут при комнатной температуре. Выделенную ДНК осаждали центрифугированием при 13000 g в течение 30 секунд.

3. Набор QIAamp® Blood Mini Kit (QIAGEN, Германия). К исследуемому образцу добавляли 200 мкл Buffer AL и 20 мкл Proteinase K. Вручную тщательно перемешивали образец, затем инкубировали 10 минут при 55°C. Центрифугировали пробирку для удаления капель с крышки. Добавляли 200 мкл 96 % этанола, вручную тщательно перемешивали образец, центрифугировали пробирку для удаления капель с крышки. Переносили смесь в QIAamp Mini Spin Column, помещенную в собирающую пробирку и центрифугировали 1 минуту на скорости 20000 g. Выбрасывали собирающую пробирку с фильтратом, переносили спин-колонку в новую собирающую пробирку, добавляли 500 мкл Buffer AW1, центрифугировали 1 минуту на скорости 6000 g. Выбрасывали собирающую пробирку с фильтратом, переносили спин-колонку в новую собирающую пробирку, добавляли 500 мкл Buffer AW2, центрифугировали 3 минуты на

скорости 20000 г. Выбрасывали собирательную пробирку с фильтратом, перенесли спин-колонку в новую собирательную пробирку и центрифугировали 1 минуту на скорости 20000 г, для полного удаления Buffer AW2. Помещали в новую 1.5 см³ микроцентрифужную пробирку и добавляли 50 мкл Buffer AE, инкубировали при комнатной температуре 5 минут, затем центрифугировали 1 минуту на скорости 6000 г для элюирования ДНК.

Флуориметрическое определение концентрации ДНК в исследуемых образцах. Концентрацию ДНК оценивали при помощи флуориметра Qubit 2.0. При работе с прибором использовали тонкостенные пробирки объемом 0.5 см³. Концентрацию ДНК измеряли в строгом соответствии с инструкциями производителя. Для измерения смешивали по 2 мкл образца ДНК и 198 мкл рабочего раствора.

Постановка qPCR. qPCR проводили на приборе CFX96 Real-Time PCR Detection System («BioRad», США) с использованием смеси qPCRMix-HS SYBR («Евроген», Россия) согласно протоколу: первичная денатурация 95°C, 3 минуты; далее следуют 35 циклов, включающие: денатурацию при 95°C в течение 30 секунд; отжиг праймеров в течение 30 секунд при температуре 63°C; элонгацию цепи при 72°C в течение 30 секунд. После циклической амплификации проводили анализ кривых плавления продуктов реакции в диапазоне температур от 64 до 95°C.

С помощью постановки qPCR в режиме температурного градиента были установлены оптимальные температуры отжига для каждой пары праймеров. Последовательности праймеров представлены в таблице 1.

Статистическая обработка данных.

Результаты представлены как среднее значение +/- стандартная ошибка среднего (SEM) двух независимых экспериментов, проводимых в двух повторностях. Анализ проводили с помощью программного обеспечения Bio-Rad CFX Manager 3.1 (Bio-Rad, США). Сравнение результатов выполняли с помощью программы GraphPad Prism 9.0 с использованием двустороннего дисперсионного анализа (ANOVA) с тестом множественных сравнений Тьюки. Значение $p < 0.05$ считалось статистически значимым, точное значение p указано на рисунках и в подписях к ним. Никакие статистические методы не использовались для предварительного определения размера выборки, но наши размеры выборки аналогичны тем, которые обычно используются в этой области [24, 25]

Обсуждение результатов

Были получены результаты флуориметрической оценки концентрации ДНК, выделенной из лейкоцитомбоцитарного слоя крови, которая была отобрана в пробирки содержащие 2 вида антикоагулянта (цитрат натрия и ЭДТА-к3) с использованием исследуемых наборов для выделения ДНК (рис. 1-2).

Была обнаружена статистически значимая разница между концентрациями ДНК, выделенной исследуемыми наборами. Наибольшая разница была выявлена между наборами Zymo Research и Plasmid miniprep, среднее значение концентраций которых составило 111.41 и 5.45 нг/мкл соответственно.

Таблица 1. Последовательности праймеров
Table 1. Primer sequences

Название	Прямой праймер	Обратный праймер
ADPRT	5'-TTT GCT CCT CCA GGC CAA CG-3'	5'-TGG AAC TTG GGA CCG CTG C-3'
COI	5'-TCT CAA CCA ACC ACA AAG ACA TTG G-3'	5'-TAG ACT TCT GGG TGG CCR AAR AAY CA-3'

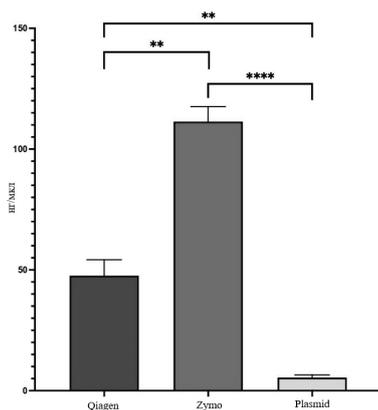


Рис. 1. Средние значения концентрации ДНК, выделенной исследуемыми наборами из образцов крови с антикоагулянтом ЭДТА-к3

(** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$)

Fig. 1. Average values of the DNA concentration isolated by the test kits from blood samples with the anticoagulant EDTA-k3

(** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$)

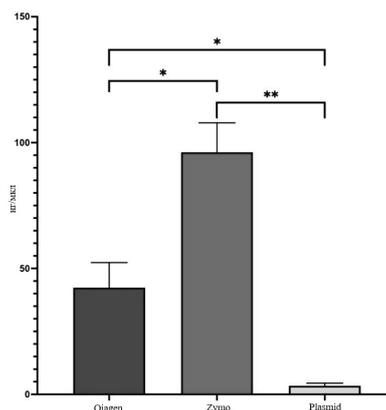


Рис. 2. Средние значения концентрации ДНК, выделенной исследуемыми наборами из образцов крови с антикоагулянтом цитратом натрия

(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

Fig. 2. Average values of DNA concentration isolated by the test kits from blood samples with anticoagulant sodium citrate (*

$p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

На рис. 2 можно наблюдать результаты аналогичные рис. 1. Среднее значение концентраций ДНК, выделенной набором Zymo Research составила 96.18 нг/мкл, а набором Plasmid miniprep 3.39 нг/мкл. Не было выявлено статистически значимой разницы между концентрациями ДНК, выделенной из крови с различными антикоагулянтами.

Для оценки соотношения мтДНК и яДНК в образцах были проведены qPCR для каждого вида антикоагулянта отдельно. Кинетика процесса амплификации соответствует стандартному виду,

четко выражена начальная фаза, экспоненциальная и фаза насыщения (рис. 3-4).

Согласно результатам qPCR анализа, значительной разницы в эффективности выделения мтДНК и яДНК разными наборами обнаружено не было (рис. 3). Однако, экспоненциальная фаза кривых накопления продуктов амплификации ДНК, выделенной набором Plasmid mini-Prep, располагается значительно ниже по сравнению с другими. Это может свидетельствовать о том, что изначально количество таргетных молекул было гораздо меньше в сравнении с другими

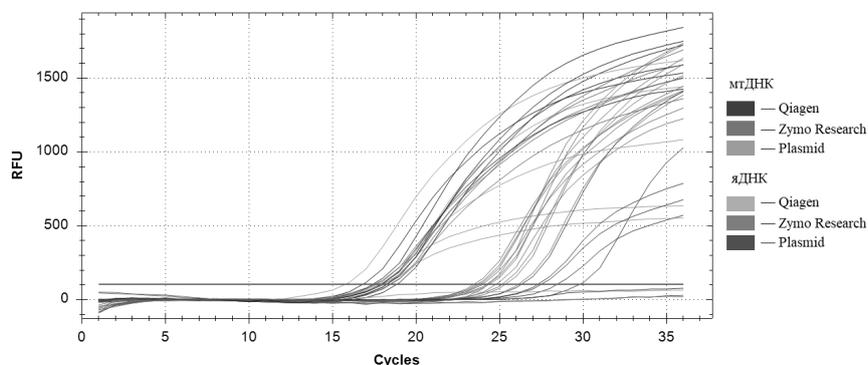


Рис. 3. Кинетика реакции накопления продуктов амплификации ДНК, выделенной из крови с ЭДТА. RFU – условные единицы флуоресценции

Fig. 3. Kinetics of the reaction of accumulation of DNA amplification products isolated from blood with EDTA. RFU – relative fluorescence units

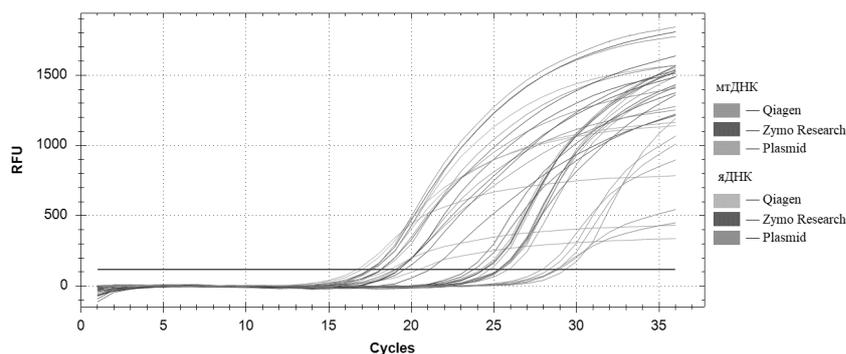


Рис. 4. Кинетика реакции накопления продуктов амплификации ДНК, выделенной из крови с цитратом натрия. RFU – условные единицы флуоресценции
 Fig. 4. Kinetics of the reaction of accumulation of DNA amplification products isolated from blood with sodium citrate. RFU - relative fluorescence units

наборами. Кроме того, кривые накопления некоторых образцов ДНК, выделенных наборами Plasmid miniPrep и Zymo Research не пересекли пороговую линию. Также наблюдалось визуальное загрязнение некоторых образцов ДНК, выделенной этими двумя наборами, что может говорить о том, что данные методы не гарантируют полную очистку ДНК от различных примесей, в том числе ингибиторов ПЦР.

На рис. 4 кривые всех образцов, независимо от метода выделения, пересекли пороговую линию. Экспоненциальная фаза кривых накопления продуктов амплификации ДНК, выделенной набором Plasmid miniPrep, также была значительно ниже по сравнению с остальными.

Согласно результатам qPCR в среднем разница между фазами выхода на экспоненту мтДНК и яДНК составила 7 циклов. Этот анализ показал высокую эффективность выделения мтДНК.

Таким образом, выделение мтДНК из лейкоцитомембранного слоя крови возможно провести путем её сорбции на колонке с силикагелевой мембраной. При этом наибольшую эффективность показал набор QIAamp® Blood Mini Kit (QIAGEN, Германия), что возможно связано с особенностью химического состава лизирующего и промывочных рас-

творов данного набора, которые позволяют наиболее полно избавиться от ингибиторов ПЦР в процессе сорбции ДНК на носителе.

Заключение

По совокупности результатов флуоресцентной оценки концентрации ДНК и анализа qPCR, среди исследуемых сорбционных наборов наибольшую эффективность для выделения мтДНК из лейкоцитомембранного слоя крови показал набор QIAamp® Blood Mini Kit (QIAGEN, Германия), основанный на использовании колонок с силикагелевой мембраной. Данный набор обеспечил оптимальную концентрацию ДНК по сравнению с набором Plasmid miniPrep (Evrogen, Россия). Кроме того, qPCR анализ показал, что данный набор обеспечивает наилучшую адсорбцию ДНК на мембране, содержащей диоксид кремния, позволяя получать очищенные образцы без различных загрязнителей, способных ингибировать ПЦР, по сравнению с двумя другими исследуемыми наборами, для которых было зарегистрировано ингибирование реакции. При сравнении потенциального влияния двух антикоагулянтов на выделение мтДНК не было выявлено значимых различий.

Работа поддержана министерством науки и высшего образования в рамках нацпроекта «Наука» (проект FZGW-2020-0001, уникальный номер реестра государственных заданий 075001X39782002).

Список литературы/References

1. Weissig V., Edeas M. *Mitochondrial Med.*, 2015, Vol. 1, pp. 1-480. DOI: 10.1007/978-1-4939-2257-4.
2. Anderson S., Bankier A., Barrell B. et al., *Nature*, 1981, Vol. 290, pp. 457-465. DOI: 10.1038/290457a0.
3. Zeviani M., Antozzi C., *Mol. Hum. Reprod.*, 1997, Vol. 3, pp. 133-148. DOI: 10.1093/molehr/3.2.133.
4. Bai R.K., Perng C.L., Hsu C.H., Wong L.J., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2004, Vol. 1011, pp. 304-309. DOI: 10.1007/978-3-662-41088-2_29.
5. Bornstein B., Area E., Flanigan K.M. et al., *Neuromuscul. Disord.*, 2008, Vol. 18, p. 453. DOI: 10.1016/j.nmd.2008.04.006.
6. Chan S.L., Copeland W.C., *Biochim. Biophys. Acta*, 2009, Vol. 1787, p. 312. DOI: 10.1016/j.bbabi.2008.10.007.
7. Marín-García J., Akhmedov A.T., Moe G.W., *Heart Fail. Rev.*, 2013, Vol. 18, pp. 439-456. DOI: 10.1007/s10741-012-9330-2.
8. Lan Q., Lim U., Liu C.S. et al., *Blood*, 2008, Vol. 112, p. 4247. DOI: 10.1182/blood-2008-05-157974
9. Xia P., An H.X., Dang C.X. et al., *BMC Cancer*, 2009, Vol. 9, p. 454. DOI: 10.1186/1471-2407-9-454.
10. Timmermans E.C., Tebas P., Ruiter J.P. et al., *Clin. Chem.*, 2006, Vol. 52, pp. 979-987. DOI: 10.1373/clinchem.2005.062901.
11. Lee H.K., Song J.H., Shin C.S. et al., *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 1998, Vol. 42, pp. 161-167. DOI: 10.1016/s0168-8227(98)00110-7.
12. Weng S.W., Lin T.K., Liou C.W. et al., *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 2009, vol. 83, pp. 94-99. DOI: 10.1016/j.diabres.2008.10.002.
13. Song J., Oh J.Y., Sung Y.A. et al., *Diabetes Care*, 2001, Vol. 24, pp. 865-869. DOI: 10.2337/diacare.24.5.865.
14. Lee J.E., Park H., Ju Y.S. et al. *Exp. Mol. Med.*, 2009, Vol. 41, p. 253. DOI: 10.3858/EMM.2009.41.4.028.
15. Elliott H.R., Samuels D.C., Eden J.A. et al., *Am. J. Hum. Genet.*, 2008, Vol. 83, pp. 254-260. DOI: 10.1016/J.AJHG.2008.07.004.
16. Brandon M.C., Lott M.T., Nguyen K.C., et al. *Nucleic Acids Res.*, 2005, vol. 33, pp. 611-613. DOI: 10.1093/NAR/GKI079.
17. Gahan M.E., Miller F., Lewin S.R. et al., *J. Clin. Virol.*, 2001, Vol. 22, pp. 241-247. DOI: 10.1016/S1386-6532(01)00195-0.
18. Chabi B., Mousson de Camaret B., Duborjal H. et al., *Clin. Chem.*, 2003, Vol. 49, pp. 1309-1317. DOI: 10.1373/49.8.1309.
19. Meissner C., Mohamed S.A., Klueter H. et al., *Forensic Sci. Int.*, 2000, Vol. 113, pp. 109-112. DOI: 10.1016/S0379-0738(00)00249-8.
20. Cady N.C., Stelick S., Batt C.A., *Biosensors & Bioelectronics*, 2003, Vol. 19, No 1, pp. 59-66. DOI: 10.1016/s0956-5663(03)00123-4.
21. Rimola A., Costa D., Sodupe M., Lambert J.F. et al., *Chemical Reviews*, 2013, Vol. 113, No 6, pp. 4216-4313. DOI: 10.1021/cr3003054.
22. Zhang Y., Cremer P.S., *Current Opinion in Chemical Biology*, 2006, Vol. 10, No 6, pp. 658-663. DOI: 10.1016/j.cbpa.2006.09.020.
23. Poeckh T., Lopez S., Fuller A.O., Solomon M.J. et al., *Analytical Biochemistry*, 2008, Vol. 373, No 2, pp. 253-262. DOI: 10.1016/j.ab.2007.10.026.
24. Smith K., Diggle MA, Clarke SC., *J Clin Microbiol.*, 2003, Vol. 41, No 6, pp. 2440-2443. doi:10.1128/JCM.41.6.2440-2443.2003.
25. Claassen S., du Toit E., Kaba M., Moodley C. et al., *Journal of microbiological methods*, 2013, Vol. 94, No 2, pp. 103-110. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.05.008>

Evaluation of the efficiency of extraction of mtDNA from the leukotrombocyte layer of human blood by commercial sorption kits

© 2021 Dvoretzkaya Yu.D.^{1,2}, Gryaznova M.V.^{1,2}, Syromyatnikov M.Yu.^{1,2}, Serzhantova O.V.³, Mikhailov A.A.³, Moshurov I.P.³, Popov V.N.^{1,2}

¹Voronezh State University of Engineering Technologies, Voronezh

²Voronezh State University, Voronezh

³Voronezh Regional Clinical Oncology Center, Voronezh

Mitochondrial DNA (mtDNA) is widely used in various kinds of research, since changes in mtDNA (mutations or large-scale deletions) can cause a wide range of diseases such as diabetes, heart dysfunctions, various forms of cancer, etc. Isolation and quantification of mtDNA is often required to study the contribution

of mtDNA to the development of pathologies. However, isolating a sufficient amount of mtDNA remains a challenge.

The aim of this study was the evaluation and comparison of three methods for the extraction of mtDNA from the human leukotrombocyte layer. All of our selected DNA extraction kits were based on the sorption extraction method, the principle of which is the special properties of silicon-based carriers for selective DNA binding. The effect of two commonly used types of anticoagulants on the efficiency of mtDNA extraction was also evaluated. Through a systematic comparison of mtDNA isolation methods, we have identified the procedure that provides the highest yield of mtDNA, which demonstrated high performance in subsequent analyses.

For mtDNA extraction, samples of the leukotrombocyte blood layer were taken from 12 volunteers and three different isolation protocols were used (Quick-DNA Miniprep Plus (Zymo Research, USA), Plasmid miniPrep (Evrogen, Russia) and QIAamp® Blood Mini Kit (QIAGEN, Germany)). Next, the amount of DNA was estimated using fluorimetry and quantitative polymerase chain reaction.

The obtained results showed that from the investigated methods of isolation, DNA extracted using the QIAamp® Blood Mini Kit (QIAGEN, Germany), based on the use of columns with a silica gel membrane, provides an optimal concentration of mtDNA. Differences between the amounts of mtDNA isolated from blood with different anticoagulants were not found. Our results emphasize the importance of choosing a method for mtDNA isolation, since this stage is crucial for obtaining high-quality mtDNA, which will be suitable for further molecular genetic studies.

Keywords: mitochondrial DNA, qPCR, fluorimetry, DNA extraction.

Дворецкая Юлия Дмитриевна – младший научный сотрудник лаборатории метагеномики и пищевых биотехнологий, ВГУИТ, Воронеж. Аспирант кафедры генетики, цитологии и биоинженерии ВГУ, Воронеж

Грязнова Мария Владимировна – младший научный сотрудник лаборатории метагеномики и пищевых биотехнологий, ВГУИТ, Воронеж. Аспирант кафедры генетики, цитологии и биоинженерии ВГУ, Воронеж

Сыромятников Михаил Юрьевич – ведущий научный сотрудник лаборатории метагеномики и пищевых биотехнологий, Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж. Доцент кафедры генетики, цитологии и биоинженерии ВГУ, Воронеж

Сержантова Ольга Викторовна – заведующая клинико-диагностической лабораторией БУЗ ВО «ВОКОД», Воронеж

Михайлов Андрей Анатольевич – заведующий хирургическим отделением БУЗ ВО «ВОКОД», Воронеж

Мошуров Иван Петрович – главный врач БУЗ ВО «ВОКОД», Воронеж

Попов Василий Николаевич – ректор Воронежского государственного университета инженерных технологий, Воронеж. Заведующий кафедрой генетики, цитологии и биоинженерии ВГУ, Воронеж

Dvoretzkaya Yuliya D. – Junior Researcher, Laboratory of Metagenomics and Food Biotechnology, VSUIT, Voronezh. Post-graduate student of the Department of Genetics, Cytology and Bioengineering, Voronezh State University, e-mail: dvd16@mail.ru

Gryaznova Mariya V. – Junior Researcher, Laboratory of Metagenomics and Food Biotechnology, VSUIT, Voronezh. Post-graduate student of the Department of Genetics, Cytology and Bioengineering, Voronezh State University, e-mail: mariya-vg@mail.ru

Syromyatnikov Mikhail Yu. – Leading Researcher, Laboratory of Metagenomics and Food Biotechnology, Voronezh State University of Engineering Technologies, Voronezh. Associate Professor of the Department of Genetics, Cytology and Bioengineering, Voronezh State University, Voronezh. e-mail: mihan.vrn@mail.ru

Serzhantova Olga V. – Head of the Clinical and Diagnostic Laboratory, BUZ VO "VOKOD", Voronezh, kdl@vokod.zdrav36.ru

Mikhailov Andrey A. – Head of the Surgical Department, BUZ VO "VOKOD", Voronezh, mikhailovaa@vokod.zdrav36.ru

Moshurov Ivan P. – chief physician of BUZ VO "VOKOD", Voronezh, moshurov@vokod.vrn.ru

Popov Vasily N. – Rector of the Voronezh State University of Engineering Technologies, Voronezh. Head of the Department of Genetics, Cytology and Bioengineering, Voronezh State University, e-mail: pvn@vsuet.ru