

УДК 543.054, 543.062

© Д. Г. Петров, Е. Д. Макарова, Н. Н. Гермаш, И. Е. Антифеев, 2019

МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ ДНК ИЗ ЛИЗАТОВ КЛЕТОК (ОБЗОР)

В представленном обзоре рассмотрены методы выделения и очистки ДНК из лизатов клеток, классифицированные по основным принципам и конкретным средствам, использованным с этой целью. Изложены известные на сегодняшний день преимущества, особенности использования и возможные ограничения для ПЦР-анализа. Использованные материалы включают как обзорные публикации, так и ряд "старых" работ, которые до сих пор не потеряли своей актуальности и являются основой для разработки современных нестандартных методов выделения и очистки ДНК.

Кл. сл.: нуклеиновые кислоты, выделение ДНК, очистка ДНК, двуокись кремния, магнитные частицы, спин-колонки, жидкофазные методы

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время молекулярные методы анализа на основе нуклеиновых кислот (НК) становятся обычными способами обнаружения, идентификации и/или количественного определения целевых организмов. Методологии на основе ДНК быстро развиваются и находят все более широкое применение для обнаружения патогенных микроорганизмов в клинических образцах, образцах пищевых продуктов и окружающей среды, в археологических и судебных исследованиях и для оценки угрозы биотерроризма. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) — процесс искусственного многократного копирования участков ДНК (амплификации целевой последовательности НК) — стала основой современного диагностического анализа благодаря ее высокой специфичности, низкому пределу детектирования и скорости, характеристикам, которые особенно важны при оценке возможности агро- и биотерроризма [1]. Амплификация фрагментов ДНК позволяет обнаруживать и количественно определять очень небольшое количество целевых клеток — теоретически для реакции достаточно всего одной копии последовательности, и, следовательно, ПЦР-метод может детектировать единственную целевую молекулу ДНК в образце [2]. Привлекательность метода ПЦР состоит и в том, что с увеличением количества данных по секвенированию могут быть разработаны ПЦР-методы анализа без преувеличения для каждого интересующего микроорганизма (групп или подгрупп микроорганизмов и т.п.) [2]. Большие потенциальные диагностические возможности ПЦР иллюстрируются, в частности, тем, что метод позволил обнаружить ДНК микобактерии тубер-

кулеза в останках людей, умерших за 2000–1500 лет до н.э., и у перуанских мумий 1000-летней давности [3].

Источниками выделяемого препарата НК могут быть клетки, вирусы, бактерии, бактериальные споры, клетки грибов или простейшие организмы и сами матрицы образцов. Многообразие исследуемых сред (клинические образцы, образцы окружающей среды, пищевые продукты) и сложность их состава обуславливают возникновение специфических проблем при разработке молекулярных методов анализа, т.к. компоненты матриц образцов могут оказывать сильное мешающее влияние на выделение НК и/или последующий анализ. Именно из-за последнего обстоятельства процессы получения НК включают сложные протоколы со множеством стадий для лизиса клеток и очистки НК. Такие протоколы могут быть "собственными", т.е. самостоятельно разрабатываются исследователями на основе общих известных принципов или модифицируются с учетом конкретных задач и объектов исследований, или же для выделения НК используются специализированные коммерческие наборы.

В идеале наборы позволяют использовать реагенты контролируемого качества с оптимизированными составами для всех стадий процесса, но даже в этом случае требуется выполнение многих ручных стадий, включающих введение образца, ферментов и буферов, чередуемых со смешиваниями (перемешиваниями), инкубацией, центрифугированием и стадиями переноса пробирок [4] (в этой же работе отмечено, что, например, набор для очистки НК компании Qiagen требует приблизительно 10 стадий пипетирования, 3 стадии механического перемешивания, 6 стадий центрифуги-

рования и 10 стадий переноса пробирок). В работе [1] авторы обращают внимание на то, что в большинстве диагностических лабораторий применяют коммерческие наборы для очистки ДНК- и ПЦР-смеси, обеспечивающие стандартизацию и контроль качества реагентов, однако это превращает ПЦР-анализ в "черный ящик" — выявление источника ошибок становится трудным при неизвестности некоторых параметров, что усложняет внесение улучшений в системы анализа. Кроме того, возможность применения и "собственных" процедур и коммерческих наборов сильно зависит от лабораторной инфраструктуры (например, наличия вытяжки для паров, гомогенизатора клеток, центрифуг, вакуумных насосов и приспособлений для токсичных сбросов) и наличия обученного персонала [5].

Немаловажным обстоятельством является также стоимость теста, при возрастании которой значительно увеличиваются расходы при обработке большого количества образцов, особенно в учреждениях и регионах с ограниченными денежными ресурсами. Кроме того, предварительные результаты, полученные на устройстве для автоматической экстракции НК, ранее показали, что необходимость ручного выполнения предварительной обработки в течение относительно долгого времени, требующегося для загрузки реагентов в устройство, и высокая стоимость используемых пластиковых изделий делают выделение НК таким устройством неэкономичным, если ежедневно обрабатываются менее нескольких десятков образцов [6]. Из-за всех этих обстоятельств по-прежнему большое внимание уделяется созданию нестандартных протоколов для выделения и очистки НК перед ПЦР-анализом, нацеленных на уменьшение стоимости, трудоемкости и продолжительности обработки, что отражается в огромном количестве публикаций, содержащих описание все новых протоколов и сравнительную оценку эффективности "новых" и "старых" методов. При этом в ряде работ стоимость процедуры рассматривается как основной решающий аргумент в пользу применения того или иного метода.

В обстоятельной работе [7] достаточно подробно изложены основные подходы к выбору методов выделения НК, безотносительно для новых ли разработок или рутинного применения. Указано, что реальной проблемой является выбор метода и/или варианта оборудования с оценкой многих факторов: требуемая степень чистоты и концентрирования НК; источник, из которого выделяют НК (тип образца и организма); метод детектирования и его аналитическая чувствительность; необходимый объем образца среды, размер анализируемой партии и время.

В большинстве процедур используют три стадии:

- высвобождение НК из образца и клетки с помощью лизиса;
- отделение НК от других клеточных веществ и/или матрицы образца;
- очистка НК, т.е. удаление ингибиторов ПЦР.

Четвертая (необязательная) стадия, концентрирование, важна при детектировании аналитов с низкой концентрацией [7]. Существует множество вариантов выполнения этих стадий, а некоторые стадии иногда могут быть пропущены или добавлены в зависимости от метода анализа и анализируемого материала (суспензии чистых клеток; предварительная обработка образца перед прямым лизисом клеток и т.п.).

Традиционно ДНК извлекают с помощью механического, ферментного или химического лизиса клеток, содержащих аналит [8]. Химические методы основаны на применении различных поверхностно-активных веществ/детергентов, хаотропных и ферментных систем. Сочетание детергентов и хаотропных солей используют для солиubilизации стенок и/или мембран клеток и для дезактивации внутриклеточных нуклеаз. Ферменты могут быть использованы для селективного разрушения некоторых типов биологических материалов, главным образом, содержащих белки; например, для разрушения матрицы могут быть использованы протеазы [9]. Из физических методов применяют растирание в ступке с пестиком (в т.ч. криогенное), ультразвуковое и микроволновое излучения, циклы замораживания—оттаивания, размалывание сферами и т.д. Часто эффективным оказывается сочетание разных методов. Краткие характеристики большинства методов лизиса приведены в работе [8]. Применительно к биологическим образцам методы лизиса, их достоинства и недостатки подробно изложены в обзоре [10], а доступные варианты механического лизиса и их характеристики освещены в обзоре [11]. Преимущество последнего метода заключается в том, что может быть обработан любой тип материала, а недостатками являются возможность перекрестного загрязнения и сложность автоматизации [9].

Если основной целью методов лизиса является достижение максимальной полноты извлечения целевой НК из образцов, то в задачи очистки входит получение на выходе препарата НК, пригодного для последующего ПЦР или другого варианта анализа, который может стать проблематичным из-за ограниченного количества, плохого качества и недостаточной чистоты НК. Предпочтительный метод экстракции всегда является компромиссом между требуемым выходом и качеством ДНК [12], т.е. происходит своеобразная "торговля" между количественным выходом и чистотой, поскольку

многоступенчатая очистка, нацеленная на получение чистого препарата НК, может приводить к потере целевой ДНК [1, 13].

В представленном обзоре рассмотрены методы выделения/очистки НК из лизатов клеток, классифицированные по основным принципам и конкретным средствам, использованным с этой целью. Изложены известные на сегодняшний день преимущества, особенности использования и возможные ограничения методов и средств, применяемых для выделения и очистки НК, пригодных для ПЦР-анализа. Использованные материалы включают как обзорные, так и оригинальные публикации, в т.ч. и ряд "старых" работ, которые до сих пор не потеряли своей актуальности.

Следует уточнить содержание и использование некоторых терминов (по примеру автора [7]): *выделение* (*separation*, или *isolation*) подразумевает отделение НК от другого материала клеток или образца, тогда как термин *очистка* (*purification*) относится к удалению веществ, ингибирующих последующий анализ (чаще ПЦР) (в англоязычной литературе термины "extraction", "isolation", "separation", "purification" применяют попеременно, часто подразумевая их равноценность [7]: например, термин "extraction" может использоваться для описания и процедуры лизиса, и всего процесса получения НК, включающего стадию очистки). В этом обзоре мы используем, в основном, термин *очистка*, подразумевая процедуру отделения НК от возможных примесей, содержащихся в необработанных ("сырых") лизатах и мешающих ПЦР, тогда как остальная терминология большей частью соответствует цитируемым работам.

1. ВЕЩЕСТВА, ИНГИБИРУЮЩИЕ РЕАКЦИЮ ПЦР

Основные преимущества метода ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) заключаются в том, что он обеспечивает быстрое обнаружение и количественное определение целевых последовательностей ДНК в различных матрицах, имеет широкий динамический диапазон для количественного определения (7–8 значений Log_{10}) и мультиплексность амплификации нескольких мишеней в единственной реакции [2]. Большая чувствительность ПЦР является и ее уязвимым местом, поскольку может приводить к ложноположительным результатам в случае загрязнения образца посторонними молекулами ДНК, тогда как получение ложноотрицательных результатов обусловлено снижением чувствительности в результате ингибирования реакции ПЦР компонентами образцов [14, 15].

Если проблема контаминации может отчасти решаться созданием чистых зон в лаборатории и контролем чистоты реагентов, воды и расходных

материалов, а также применением закрытых картриджей, то бесспорной проблемой остается процесс выделения из сложных образцов целевой ДНК. Оптимальные протоколы обработки образцов являются ключевым условием для ПЦР-анализа, т.к. неэффективная обработка мешает высвобождению ДНК из образцов и приводит к низкой чувствительности тестов. Целью обработки образцов является приготовление образца для ПЦР-амплификации, включающее: 1) концентрирование целевой НК; 2) удаление/нейтрализация ПЦР-ингибиторов; 3) получение более однородного образца для обеспечения лучшей повторимости амплификации [16].

К ПЦР-ингибиторам относят все вещества, которые оказывают негативное влияние на ПЦР; и источниками ПЦР-ингибиторов могут быть как сами образцы, так и реагенты, применяемые в процессе обработки образцов и экстракции НК [17]. Помимо природы вещества-ингибитора для проявления ингибирующего эффекта имеет значение и концентрация соединений. Описание природы и предполагаемого или уже установленного механизма действия многих ингибиторов, а также ряда методов преодоления ингибирования содержатся в работах [1, 16, 18–25]. Указанные работы содержат перечни веществ, которые должны быть удалены в процедурах очистки, однако сведения о предельных концентрациях могут достаточно сильно различаться. Основными ингибиторами в образцах крови являются вещества, содержащие гем (гемин, гематин), лактоферрин, иммуноглобулин G; в образцах почв — гуминовые и фульвиновые вещества и их производные, содержащиеся в больших количествах. Основными реагентами-ингибиторами являются этанол, ЭДТА, фенол, изопропанол, а также избыток KCl, NaCl и некоторых других солей, ионные детергенты, такие как деоксихолат натрия, саркосил и додецилсульфат натрия (SDS), которые должны удаляться перед амплификацией или их содержание должно быть снижено до приемлемых значений (в зависимости от типа полимеразы).

Устранение ингибирующего эффекта иногда достигается разбавлением проб, увеличением количества ДНК полимеразы в ПЦР-реакции или использованием добавок, таких как бычий сывороточный альбумин или другие улучшители амплификации. Однако эти простые варианты далеко не всегда являются действенными и не всегда производят ожидаемый только положительный эффект. Именно поэтому выбор эффективных методов выделения и очистки НК из лизатов клеток имеет решающее значение для получения правильных и надежных результатов ПЦР-анализа.

2. МЕТОДЫ ОЧИСТКИ ДНК В СИСТЕМАХ ЖИДКОСТЬ—ЖИДКОСТЬ

Классический способ очистки и концентрирования НК из лизатов клеток заключается в смешивании аликвоты лизата со смесью фенола и хлороформа и последующим образованием водной и органической фазы [9, 26–29]. После расслаивания ДНК находится в водной фазе, а денатурированный клеточный материал остается внутри органической фазы, отделяемой центрифугированием, что позволяет удалить белки, липиды, углеводы и осколки клеток. Фенол является сильным протеолитическим агентом и облегчает лизис клеточных оболочек, тогда как хлороформ является хорошим детергентом, денатурирующим белки, и основным растворителем жиров, способствуя удалению липидного слоя оболочек таких клеток, как микобактерии [30].

Для увеличения эффективности очистки в ряде работ используют смесь фенол—хлороформ—изоамиловый спирт (25:24:1) [26, 28, 31]: при расслаивании в этой системе происходит распределение НК в водную (верхнюю) фазу и осаждение белков на межфазной границе фаз [26, 31]. Изоамиловый спирт добавляют для предотвращения вспенивания и улучшения разделения органической и водной фаз [26]. После центрифугирования ДНК, содержащаяся в водной фазе, осаждают этанолом или изопропанолом, промывают осадок 70 % этанолом для удаления солей и мелких органических молекул, подсушивают и ресуспендируют в буфере, создавая требуемую концентрацию. (Следует указать, что при этом важную роль имеет значение pH, т.к. ДНК переходит в водную фазу при значениях pH 7–8 и в органическую фазу при pH 4–6 [32]; кроме того, высокие концентрации соли могут вызвать инверсию фаз [26].)

При ранних диагностических применениях ПЦР экстракцию фенолом успешно использовали при подготовке ДНК для амплификации, т.к. фенол быстро денатурирует белки [33] и очень эффективно дезактивирует микробы (но остатки фенола могут ингибировать амплификацию) [6]. Протоколы с применением органических растворителей имеют такие преимущества, как низкая стоимость и то, что они не требуют специальных материалов и оборудования и пригодны для экстракции ДНК из многих типов микроорганизмов [34]. Недостатки включают длительность и трудоемкость манипулирования: от 4 до 6 замен пробирок, инкубацию, осаждение, промывание, высушивание и повторные ресуспендирования [34]. Кроме того, в зависимости от протокола, они дают сильно варьируемые выходы ДНК и/или не удаляют некоторые соединения и осколки клеток, мешающие последующим применениям [34],

и создают такие проблемы, как неполное разделение фаз [28]. Из-за токсичности реагентов и сложного многостадийного манипулирования экстракция органическими растворителями не считается идеальной [9] и непрактична для обработки большого количества образцов [6]. (Поскольку и фенол, и хлороформ являются опасными реагентами, экстракцию проводят в соответствии с регламентами биобезопасности.)

Тем не менее двухфазные водно-органические системы часто используют в качестве стандартного метода сравнения при оценке эффективности новых способов экстракции и для очистки НК из сложных образцов (например, в недавней работе [35] протокол с помощью системы фенол—хлороформ—изоамиловый спирт и осаждения ДНК из водной фазы изопропанолом успешно использован для очистки ДНК микробных сообществ из почв с высоким содержанием солей и глины). Отмечено, что этот метод экстракции все еще остается популярным среди экспертов судебного сообщества, и на него иногда ссылаются как на "золотой стандарт" для экстракции ДНК отчасти из-за универсальной способности экстрагировать ДНК из множества разных типов образцов [36]. Кроме того, методы с применением фенола все еще полезны, когда желательна получение очень чистого продукта [7] (протоколы выделения, очистки и концентрирования ДНК с помощью органических растворителей с указанием особенностей и осложняющих факторов приведены в работе [26]).

Несмотря на недостатки, интерес к методам жидкофазной очистки не ослабевает, и предпринимаются попытки усовершенствовать и упростить процедуру, применяя новые подходы и реагенты. Например, предложен метод, в котором минимизировано количество стадий до простой процедуры и исключены стадии осаждения спиртом — весь процесс занимает 50 мин для 12 образцов [37]. В этом протоколе клетки лизируют фенолом, а лизат очищают экстракцией хлороформом — утверждается, что полученная ДНК пригодна для молекулярных методов анализа.

Для сохранения преимуществ метода, но уменьшения токсического действия реагентов и устранения ручных стадий разработан чип для очистки НК при выделении ДНК или РНК из бактерий (от 5000 до 1 клетки) в объеме 1 мкл или 125 нл [38]. Водную фазу лизата помещают в массив микролунок, а фазу фенол—хлороформ вводят в канал верхнего пространства, соединяющий этот массив. Непрерывный поток органической фазы увеличивает межфазный контакт и выход НК (в 10 раз) по сравнению с твердофазным методом на основе колонки. Полученную НК можно или направить на ПЦР-анализ, или провести ПЦР в тех же мик-

ролунок, предотвращая потерю образца во время переноса жидкости [38].

Смесь тиоцианат гуанидина—фенол—хлороформ, предложенную для экстракции РНК в одноступенчатой процедуре [32], впоследствии стали применять и для очистки ДНК. Этот реагент доступен под названиями Sigma-Aldrich TRI Reagent® и Thermo Fisher TRIzol® Reagent и обеспечивает высокую чистоту и высокий выход НК [32]. Недавно показано, что реагент Brazol® (Lab Trade, Brazil), включающий эту смесь, обеспечивает эффективное извлечение ДНК из микобактерий [30] (хаотропный реагент, тиоцианат гуанидина, инактивирует эндонуклеазы, предотвращает связывание ДНК с другими молекулами и облегчает отделение осколков клеток).

Нетоксичный реагент DNAzol®, содержащий тиоцианат гуанидина и смесь детергентов в готовой к использованию форме, быстро и эффективно выделяет ДНК из разных биологических образцов [39, 40]. В стандартном протоколе образец гомогенизируют (лизируют) в реагенте, ДНК осаждают этанолом, промывают, растворяют в 8 мМ NaOH и устанавливают требуемый pH. Весь процесс занимает 20–30 мин, и ДНК пригодна для ПЦР. Образцы можно хранить в реагенте при комнатной температуре длительное время, поэтому DNAzol® применим для сбора образцов в поле [39]. Модификация метода — обработка реагентом DNAzol (65 °С, 5 мин) и последующая очистка на колонке — позволила исключить осаждение этанолом и получить геномную ДНК высокого качества из бактерий разных видов и грибов за ~0.7 ч [41].

Новым подходом к реализации жидкофазной экстракции является применение ионных жидкостей (ИЖ) — достижения, варианты и особенности их применения в миниатюризованных экстракционных системах изложены в обзоре [42]. В отличие от обычных растворителей, ИЖ имеют низкие значения летучести, воспламеняемости и давления паров, долговременную температурную и химическую стабильность [42]. В работе [43] описано применение гидрофобной ИЖ для одновременного лизиса бактериальных клеток (при 120–150 °С) и получения ДНК. Преимущество метода — быстрота и отсутствие центрифугирования, т.к. расслоение фаз происходит самопроизвольно; верхняя водная фаза, содержащая ДНК, легко отделяется, и ДНК можно анализировать методом ПЦР без дополнительной очистки. О возможности использования ИЖ для быстрой экстракции ДНК из пищевых продуктов и грамотрицательных бактерий сообщается в работе [5]: образцы инкубируют с ИЖ несколько минут при заданной температуре, и выделенная ДНК готова к амплификации. Кроме того, ИЖ сохраняют экстрагированную ДНК при комнатной температуре

до 20 дней. По мнению этих авторов, применение ИЖ является одним из наиболее перспективных подходов для быстрой и простой экстракции ДНК, которая будет использована для диагностики в полевых условиях, несмотря на то, что ИЖ необходимо оценивать для каждого желательного целевого организма и матрицы образца.

3. МЕТОДЫ ОЧИСТКИ НА ОСНОВЕ ОСАЖДЕНИЯ БЕЛКОВ И ДНК

К таким методам следует отнести методы выделения и очистки ДНК, основанные на применении осаждения ДНК из растворов образцов при проведении специальной обработки или добавления осаждающих реагентов. Например, в одном из таких экспресс-протоколов клинический образец с добавленным лизирующим буфером подвергают термической обработке, при которой происходит разрушение клеточных мембран и высвобождение ДНК; при центрифугировании нерастворимые компоненты осаждаются, а супернатант, содержащий ДНК, используют для ПЦР [44]. Согласно этой работе, методика пригодна лишь для качественного анализа, т.к. дополнительной очистки препарата НК от посторонних примесей не проводится.

К этой же группе методов можно отнести выделение ДНК с использованием высоких концентраций солей (обычно 6 М NaCl), добавляемых к лизату клеток, полученному после обработки исходного образца клеток смесью SDS с протеиназой К, после чего применяют центрифугирование для разделения осадка белка и водного раствора ДНК в супернатанте [33]. Для осаждения белков может также использоваться изменение значения pH и последующее центрифугирование (1500 об./мин, 15 мин), что позволяет удалить денатурированные белки и клеточные фрагменты [45]. Для извлечения ДНК из раствора может применяться 96 % этанол в присутствии солей, вызывающий осаждение ДНК, которую отделяют центрифугированием с последующим отмыванием от примесей 70 % спиртом; однако недостатком метода является одновременное осаждение белков [44, 45].

Обратимая денатурация и осаждение спиртом (этанолом или изопропанолом) с последующим центрифугированием является стандартным методом извлечения ДНК из лизатов клеток и суспензий [27, 33]. Поэтому на завершающей стадии во многих методах экстракции применяют осаждение НК из водной фазы этанолом или изопропанолом; в последнем случае можно применять меньшие объемы и, как считается, значительно уменьшать загрязнение экстрактов ДНК ингибиторами ПЦР [31]. Осаждение НК можно выполнить и полиэтиленгликолем, хорошо уменьшающим степень загрязнений, но извлекающим только ~50 % НК [31].

Учитывая, что ДНК плохо осаждается в отсутствие соли, особенно при низкой концентрации, осаждение выполняют, добавляя 3 М раствор ацетата натрия (рН 5.2) или 7.5 М раствор ацетата аммония (рН 8) [27]. Большинство солей и маленьких органических молекул растворимы в 70 % этаноле, поэтому осаждение 96–100 % этанолом и промывание сгустка будет эффективно обессоливать ДНК. Однако значительно труднее удалить NaCl вследствие его лучшей растворимости в 70 % этаноле, и его использование может помешать очистке [26].

Методы высаливания применяются и/или модифицируются и в настоящее время, причем к основным преимуществам процедур относят простоту и низкую стоимость реагентов. В работе [46] подробно рассмотрены разные протоколы с использованием метода высаливания и предложен собственный протокол получения ДНК из периферической цельной крови с чистотой, достаточной для генотипирования. При двойном последовательном осаждении белков и ДНК (6 М NaCl и изопропанол), выполненном в работе [47] при выделении ДНК из крови, получена ДНК с чистотой, сравнимой с ДНК, выделенной с помощью коммерческого набора QIAamp Blood Mini Kit (Qiagen), но с большим выходом и значительно меньшей стоимостью. Это позволило авторам рекомендовать метод для применения в учреждениях с ограниченными ресурсами. Модифицированная процедура последовательного осаждения белков и ДНК применена для получения больших количеств очень чистой ДНК из минимальных количеств птичьей крови (≤ 50 мкл) [48]. В протоколе используют буфер, лизирующий клетки и осаждающий белки, и последующую обработку абсолютным этанолом. Совершенно очевидно, что количество предлагаемых в последнее время вариантов и небольших модификаций метода этими работами не ограничивается.

4. ОЧИСТКА ДНК С ПРИМЕНЕНИЕМ ТВЕРДЫХ ФАЗ

4.1. Общая характеристика

Для замены очистки органическими растворителями применяют 2 основных подхода на основе твердых матриц — связывание целевой НК твердой фазой или, напротив, сорбция примесей и ингибирующих веществ. Большинство методов основано на сорбции НК твердой фазой, содержащей двуокись кремния (SiO_2): частицами SiO_2 , спин-колонками на основе стекловолокна и частиц SiO_2 , магнитными сферами в присутствии хаотропных солей гуанидина. Хаотропные соли дестабилизируют водородные связи и гидрофобные взаимо-

действия, денатурируют белки (включая нуклеазы) и разрушают ассоциацию НК с водой, облегчая связывание ДНК с мембраной SiO_2 , после чего примеси и загрязнения удаляют промыванием раствором, содержащим детергент и/или спирт (обычно этанол) [34]. Высокое сродство между отрицательно заряженными НК и положительно заряженной матрицей двуокиси кремния, приводящее к селективному связыванию НК с SiO_2 в присутствии многих других компонентов лизатов клеток, позволяет успешно применять эти устройства для очистки НК. Твердофазный принцип может применяться в разных форматах, таких как картриджи, фильтры, спин-колонки, частицы и парамагнитные сферы, а также 96-луночные проточные микропланшеты, содержащие SiO_2 [9, 49].

В следующих разделах подробно рассмотрены методы выделения и очистки НК с помощью колонок и фильтров, магнитных частиц и ионообменных материалов на примере смолы Chelex. Раздел с описанием колонок содержит также описание новых подходов на примере применения некоторых целлюлозных и полимерных материалов.

4.2. Методы очистки на основе применения частиц

Наиболее привлекательными и часто используемыми методами являются твердофазные методы извлечения НК на основе двуокиси кремния (SiO_2), активно разрабатываемые и модифицируемые с момента первого использования SiO_2 в 1979 г., и ее применения для очистки НК в присутствии хаотропных веществ [50]. В основе большинства систем для очистки НК лежат уникальные свойства SiO_2 селективно связывать ДНК, и технология применения стеклянных сфер для очистки ДНК является одной из старейших, когда в качестве хаотропного агента еще использовали иодид натрия [26]. При описании этого протокола отмечено, что метод легче и проще выполняется, чем органическая экстракция, однако выход ДНК несколько меньше (50–75 %) и для увеличения выхода рекомендуется повторная экстракция или увеличение времени инкубации до 5–10 мин.

Применяемые материалы включают: стеклянные частицы, находящиеся или в виде порошка, как в случае стационарной фазы при хроматографии, или в форме микросфер; суспензии частиц SiO_2 ; диатомитовую землю с содержанием SiO_2 от 80 до 90 % [28, 32]. Например, набор QIAEX II gel extraction kit (Qiagen) был основан на селективной адсорбции НК на частицах силикагеля QIAEX II в присутствии хаотропных солей и использован для очистки ДНК некоторых пищевых продуктов [22]. Частицы могут вноситься прямо в образец, или очищаемый образец пропускается через колонку с SiO_2 . В первом случае частицы

после адсорбции НК могут собираться фильтрованием или центрифугированием, поэтому этот вариант использования применяется значительно реже по сравнению с колонками или магнитными частицами (например, в перечне из ~250 коммерческих наборов, выпускавшихся 36 компаниями для ручной экстракции ДНК в 2012 г., только 6 наборов были основаны на применении суспензий SiO_2 и кремнийсодержащих частиц [51]).

Тем не менее в работе [52] не только описано применение суспензии частиц SiO_2 для выделения плазмидной ДНК и ДНК растительных материалов, но и сформулированы основные преимущества частиц по сравнению с наборами на основе колонок. К основному преимуществу относят низкую стоимость процедуры (0.15–0.05 \$) [52]. Кроме того, в отличие от колонок количество добавляемых частиц SiO_2 можно варьировать в зависимости от ожидаемого количества ДНК, частицы легко и быстро выделяются центрифугированием, а объем элюирования может быть уменьшен до 5 мкл, и, наконец, нагревание при элюировании выполнять значительно легче и удобнее. О преимуществах использования суспензии частиц SiO_2 сообщают и авторы [53], применившие этот метод для выделения геномной ДНК из одиночных маленьких личинок и куколок насекомых. Метод признан быстрым, эффективным, простым и очень дешевым (при замене NaI на NaCl общая стоимость 50 процедур составляет менее 5 \$), обеспечивая высокий выход ДНК хорошего качества из очень маленьких образцов, и может быть рекомендован для лабораторий с низким бюджетом.

Выявление лучшего метода для экстракции малых количеств ДНК из древних останков медведей (костей возрастом ~20 000 лет) выполнено сравнением результатов ПЦР, полученных при выделении ДНК с помощью частиц SiO_2 , системы фенол—хлороформ, осаждения этанолом и коммерческого набора DNeasy[®] tissue kit (Qiagen) [54]. Сделан вывод, что метод очистки на основе частиц SiO_2 значительно превосходит по количеству выделенной ДНК все остальные методы, и установлено, что суспензии частиц, старше 1 месяца, нельзя использовать для образцов с очень маленьким количеством копий ДНК. В общем случае улучшение процесса амплификации в случае старой ДНК можно получить при добавлении бычьего сывороточного альбумина.

В последние годы создаются и исследуются различные типы частиц, предназначенных для выделения НК. При разработке быстрого недорогого метода получения ДНК из разных почв для изучения бактериального разнообразия очистку от ингибиторов проводили 1 % активированным углем [55]. Уголь, имеющий большую площадь поверхности и позволяющий адсорбировать гуминовые

вещества, таниновую кислоту, тяжелые металлы и другие ингибиторы ПЦР, вводили непосредственно в экстрагирующий буфер для устранения обычно применяемой многостадийной очистки.

Разработан протокол быстрого выделения ДНК с помощью полимерных микросфер в качестве адсорбента, причем улучшение адсорбции или удаление ДНК осуществляют регулированием концентрации NaCl [56]. Адсорбция ДНК облегчается при низкой концентрации соли, а удержанную ДНК можно легко извлечь раствором NaCl (1 моль/л), увеличивая выход до ~80.7 %. Такие микросферы, получаемые с помощью эмульсионной полимеризации в системе вода/масло, использовались для выделения плазмидной ДНК из культур клеток *E. coli* с лучшими характеристиками по сравнению с коммерческим набором Plasmid Miniprep Kit [56].

Предложены новые методы сепарации НК многослойными нанотрубками углерода в качестве адсорбентов [57, 58]. Например, окисленные устойчивые в воде многослойные нанотрубки адсорбируют некоторые формы НК (РНК с высоким молекулярным весом, хромосомальную ДНК, линейные и денатурированные формы плазмидной ДНК), но не адсорбируют сверхсвернутую форму плазмидной ДНК. Поэтому НК, связанные с нанотрубками, могут легко удаляться центрифугированием, тогда как сверхсвернутая плазмидная ДНК остается в растворе [57]. В другом варианте применения фенол, скомпонованный с нанотрубками, может удалять белки, полисахариды и полифенольные компоненты, что было использовано для быстрого и эффективного выделения геномной ДНК из растительных материалов [58]. Показано, что полимерные ионные жидкости можно использовать в качестве покрытия сорбентов и применять для твердофазной микроэкстракции и очистки ДНК из матриц биологических образцов перед проведением ПЦР-РВ [59].

Несмотря на появление новых адсорбирующих материалов в виде частиц, самыми распространенными остаются коммерческие наборы и креативные протоколы, основанные на применении колонок с частицами SiO_2 , спин-колонок с мембранами и стекловолокном и магнитных частиц. Применение колоночных методов, магнитных частиц и анионообменных смол типа Chelex рассмотрены в следующих разделах.

4.3. Методы очистки ДНК на основе колонок

В основе этого метода очистки ДНК лежит использование колонки, содержащей мембраны или частицы, которые адсорбируют ДНК, и чаще всего для этой цели применяют материалы на основе двуокиси кремния (SiO_2) [34], хотя могут применяться и частицы другой природы (диатомитовая

земля, ионообменные материалы и т.п.) [32]. Адсорбция достигается в присутствии реагентов, содержащих хаотропные соли (в основном, соли гуанидина) при определенном pH, в процессе или после стадии лизиса [34]. Хаотропные соли дестабилизируют водородные связи и гидрофобные взаимодействия, денатурируют белки (включая нуклеазы) и разрушают ассоциацию НК с водой, облегчая связывание ДНК с мембраной SiO₂. Затем все загрязнения удаляют на стадиях промывания раствором, содержащим детергент и спирт (обычно этанол) — спирт предотвращает растворение ДНК, позволяя удалить другие компоненты образца. В конце ДНК элюируют низкокачественным буфером или водой. В зависимости от характеристик колонки пропускание пробы, промывание и элюирование из колонки выполняют, используя силу тяжести, давление, центрифугирование или вакуум.

Хотя все варианты колоночной экстракции основаны на одних и тех же принципах, коммерческие наборы классифицируют в соответствии с источником образца, так что каждая торговая марка имеет свою "специализацию". Компании-разработчики предлагают наборы для экстракции ДНК из микробных клеток, тканей животных и растений, крови, почвы, воды и пищевых продуктов. Например, Nucleospin Food Kit (Macherey-Nagel), PowerFood[®] Microbial DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories) или DNeasy mericon Food Kit (Qiagen) — для пищевых продуктов; PowerWater[®] DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories), RapidWater[®] DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories) или SuperPrep[™] Water RNA/DNA Purification Kit (Fisher Scientific) — для воды [34]. Основным отличием между ними являются стадии предварительной обработки образца и лизиса, адаптированные к типу матрицы в соответствии с их специфическими характеристиками.

Огромный, но не исчерпывающий перечень коммерческих наборов на основе колонок и фирм, выпускающих наборы для ручного манипулирования, приведен в работе [51]. Некоторые из разработанных систем включают опцию механического лизиса, вводя ее как часть предварительной обработки, а в автоматические системы Roche и Qiagen добавлены необязательные внешние системы механического лизиса [7]. Наборы компании Qiagen, которые оптимизированы для работы с многообразием типов образцов, считаются "золотым стандартом" для приготовления НК [7] и часто используются для оценки эффективности новых методов [60–63].

К достоинству метода следует отнести возможность концентрирования НК при элюировании маленькими объемами буфера/воды на конечной стадии протокола [7]. Технология на основе колонок

достаточно проста для применения к большому количеству образцов одновременно, обычно обеспечивая высокий выход, концентрацию и чистоту ДНК, позволяя стандартизировать обработку образцов, причем коммерческие наборы содержат перечень возможных проблем и способы их устранения [34]. По мнению авторов работы [32], экстракция НК на основе колонок является одним из лучших методов среди доступных вариантов, давая быстроту и воспроизводимость результатов при использовании твердой стационарной фазы, обеспечивающей быструю смену буферов и, таким образом, эффективную экстракцию НК. Однако, с другой стороны, отмечается, что колоночная экстракция является наиболее трудоемкой, а автоматизированные альтернативы труднодоступны [34]. Возможная причина последнего — необходимость значительных капитальных вложений и лабораторного пространства, и не для всех учреждений может быть доступен каждый из этих факторов [64].

К недостаткам колонок, важным для практического применения, относят возможность засорения пор мутными или вязкими типами образцов, содержащих, например, липиды и обломки образцов [7, 60], а также необходимость выполнения отдельных стадий загрузки и пропускания растворов для связывания, промывания и элюирования [7]. В частности, физические характеристики мембран и колонок со сферами приводят к значительному жидкостному сопротивлению, ограничению типа и/или общего объема образцов, которые можно обработать без засорения пор [65]. Основные недостатки связаны также со стоимостями, которые могут стать значительными при анализе большого количества образцов, и то, что метод может занимать много времени и быть трудоемким в зависимости от процедур обработки, выполняемых перед применением набора [34]. В этой же работе отмечается также, что с помощью любой технологии, основанной на применении SiO₂ без покрытия специфическими функциональными группами, невозможно отделить ДНК от некоторых других загрязняющих веществ, подобных фенольным соединениям и гуминовым веществам, содержащихся в почвах в больших количествах, которые и адсорбируются, и элюируются вместе с ДНК. Поэтому может потребоваться предварительная стадия обработки для удаления этих соединений. К худшей стороне метода, как и всех методов на основе SiO₂ [32], относят неспособность эффективно извлекать маленькие фрагменты ДНК, т.к. они прочно и часто необратимо связываются с матрицей SiO₂, а также необходимость иметь маленькую центрифугу в составе оборудования. По мнению авторов [66], главным недостатком коммерческих наборов, в большей части которых

используют спин-колонки на основе SiO_2 , является неполное извлечение геномной ДНК из малых количеств клинических образцов или образцов окружающей среды, содержащих низкий уровень бактерий, что существенно при исследовании метагеномики.

Кроме того, коммерческие наборы для однократного использования, являются дорогими для большинства лабораторий и создают пластиковые отходы, негативно воздействующие на окружающую среду, поэтому в работе [67] рассмотрены и изучены различные варианты регенерации колонок. Показано, что лучшим способом регенерации является обработка 1 М фосфорной кислотой, и регенерация позволяет использовать колонки для очистки ДНК как минимум 5 раз при сохранении рабочих характеристик, имеющихся у новых колонок.

Стоимость ДНК тестов, включающих процедуру выделения ДНК из сложных образцов, имеет большое значение, особенно при диагностическом использовании методов ПЦР и в еще большей степени для учреждений с ограниченными денежными ресурсами. В работе [68] подчеркивается, что коммерческие одноразовые спин-колонки или планшеты имеют стоимость выше общей стоимости классических методов очистки. Типичные наборы со спин-колонками, такие как Qiagen kit, требуют затрат ~4 \$ на образец ДНК и 7 \$ для РНК в США (при стоимости самой колонки ~1 \$), причем в некоторых случаях можно столкнуться с большей стоимостью или ограниченным доступом к наборам, особенно в развивающихся странах [68]. Именно этим, по мнению авторов [68], объясняется стремление к разработке "домашних" протоколов или повторному использованию колонок после их регенерации. Указанные авторы считают, что изготовление собственной спин-колонки или планшета может быть эффективным подходом, пригодным по общей стоимости (~0.1 \$ за колонку), описывают процедуру изготовления колонок на основе фильтрующей бумаги из целлюлозного волокна и сообщают о некоторых ограничениях при их применении.

В случае одинаковых стоимостей коммерческих наборов исследователи обращали внимание не только на выход и качество ДНК, но и на такие характеристики, как длительность процесса, легкость использования, необходимость дополнительного оборудования, возможность применения в полевых условиях. Например, в работе [69] проведено сравнение характеристик платформ со спин-колонками QIAamp mini platform (Qiagen) и QuickGene-Mini80 platform (Fuji Film), использованных для детектирования некоторых биологических агентов (*Bacillus anthracis* и т.п.) с точки зрения возможности применения в клинических уч-

реждениях с ограниченными ресурсами. Время получения результата в последнем случае на 90 мин меньше (при обработке 48 образцов), и, хотя стоимости были одного порядка, составляя 2.45 и 2.60 \$ соответственно, легкость использования, отсутствие центрифугирования, портативность (вес 3 кг) позволили сделать вывод о предпочтительности использования именно этой платформы. Вариант QuickGene (Kurabo) относят к ресурсно-ограниченным устройствам с выделением НК связыванием с пористой мембраной под давлением [7]. Компания Fuji Film Life Science представила на рынок также системы QuickGene для выделения НК на основе спин-картриджей с такой же запатентованной пористой мембраной толщиной 80 мкм, что на порядок тоньше мембран из стекловолокна, поэтому, как сообщается, для фильтрации не требуется высокого давления, иногда разрывающего молекулы НК. В то же время, как указано в проспекте компании, предлагаются системы QuickGene-810 и QuickGene-610L на основе таких мембран с автоматическими стадиями инъекции образца в картридж, промывки и элюции, включающие 6 наборов реагентов для выделения НК из разных клинических образцов, причем для выделения ДНК/РНК необходима обычная центрифуга (или микроцентрифуга).

В качестве примеров систем с малой лабораторной автоматизацией в работе [7] указаны спин-колонки на основе двуокиси кремния QIAcube (Qiagen), а для больших партий (96 образцов) предназначены системы на основе планшетов с колонками Wizard (Promega) и со стекловолокном QIAextractor (Qiagen), работающие с применением вакуума.

Для улучшения эффективности и упрощения очистки НК разработан подход на основе пористой монолитной связывающей матрицы (TruTip[®]), подстраиваемой по геометрии и вводимой в одноразовые наконечники пипеток с объемами от 1.0 до 5.0 мл [65]. Геометрия и пористость монолита приспособлены для минимизации засорения, а его толщина обеспечивает достаточную емкость связывания НК при этих объемах образца. Отличительной особенностью протокола TruTip является отсутствие переноса жидкостей: процедура состоит из циклического движения жидкости через матрицу, тогда как устройство TruTip остается в лунке планшета с реагентами [64]. Двухнаправленный поток в циклических процессах обеспечивает достаточное время контакта между образцом и монолитом для эффективного извлечения НК из вязких образцов и элюирования. Большая пористость монолита позволяет вязким или сложным образцам легко проходить через него с минимальным обратным давлением жидкости, однако гомогенизация и разжижение образцов остаются важными

стадиями, т.к. однородный и разжиженный лизат движется с высокой скоростью, уменьшая общее время обработки [65]. Простота концепции делает устройство легко адаптируемым и эффективным для ряда матриц клинических образцов и входных объемов, причем, как сообщают авторы, присутствие фоновой ДНК не является проблемой, пока общее количество НК в образце не превысит емкости монолита. Метод TruTip® стал основой новой автоматизированной платформы для экстракции ДНК/РНК из разных клинических образцов — TruTip® Automated Sample Prep Workstation (Akonni Biosystems, USA) [64, 70–72]. Платформа включает запатентованную технологию гомогенизации и лизиса трудных для разрушения клеток перед извлечением и очисткой НК на основе нового принципа — сочетания вращающегося магнитного диска с немагнитными частицами.

В работе [63] приведены результаты оценки 6 технологий экстракции НК из "слепой" панели сложных клинических образцов (кровь, испражнения, мокрота) для выбора метода, пригодного для применения в учреждениях с ограниченным ресурсом. Сделан вывод о лучших характеристиках технологий Akonni Biosystems, Inc. (USA) и Mol-Bio Diagnostics (India), попеременно занимающих 1-е и 2-е места в зависимости от оцениваемых характеристик [63]. (В сравнительном исследовании инновационных устройств и методов выделения НК участвовали также разработчики из США: Clarent Biosolutions, Integrated Nano-technologies, Paratent Diagnostics и Vanderbilt University.)

В отличие от исследований и разработок, нацеленных на изучение материалов мембран, в работе [73] рассмотрено влияние составов "креативных" буферов (для связывания, промывания и элюирования НК) на эффективность извлечения плазмидной ДНК с помощью коммерческих наборов на основе колонок. Результатом работы стали рекомендации по оптимизации составов буферов, входящих в наборы, с использованием приемлемых по стоимости реагентов, позволяющих увеличить выход ДНК.

Процесс выделения ДНК с помощью колонок имеет два основных механизма потерь ДНК: неэффективность адсорбции и неэффективность элюирования из колонки, а механизм адсорбции и элюирования при низких концентрациях ДНК полностью не понят [74]. Поэтому в работе изучены процессы адсорбции и элюирования на частицах SiO₂ по протоколам стандартных наборов Qiagen при имитации низкого содержания ДНК в образцах (≤1 мкг). Установлено, что низкие значения pH и присутствие тиоцианата гуанидина (GuSCN) улучшают адсорбцию ДНК, но при элюировании стандартным низкосолевым буфером с высоким pH более 70 % ДНК не извлекается,

кроме случаев, когда ДНК адсорбируют в присутствии 5 М GuSCN при pH 5.2. Оценка баланса масс при адсорбции и элюировании показала, что неизвлеченная ДНК или не адсорбировалась изначально, или необратимо связывалась на поверхности SiO₂, однако извлечение улучшилось при элюировании при 95 °С формамидом и 1 М NaOH, свидетельствуя о необходимости создания оптимизированных реагентов для максимального выхода НК.

Изучение влияния полей разной природы, температурного или ультразвукового, на величину выхода ДНК из модельных растворов плазмиды *M. tuberculosis* при использовании спин-колонок проведено в работах [75, 76]. Выявлены оптимальные условия для увеличения максимального выхода — в 1.5 раза при повышении температуры колонки при адсорбции до 70 °С и в 2 раза при создании фокусирующего ультразвукового поля с интенсивностью 2.0 Вт/см². В этих работах рассмотрено также влияние физико-химических, гидродинамических и акустических процессов на полученные результаты.

Кроме материалов спин-колонок на основе SiO₂ для эффективного выделения ДНК могут применяться и другие носители, такие как Sepharose 4B, Sephadex G-200, Sephadex G-75 и Sephadex G-50, поливинилполипирролидон (ПВПП). Метод на основе спин-колонок с ПВПП позволил извлекать ДНК высокого качества с выходом 91 % из лизата микробных клеток почвы, поэтому авторы [77] предложили такие протоколы для получения концентрированной ДНК высокой чистоты с высоким молекулярным весом из образцов глин и почвы с большим содержанием SiO₂. Колонки с исключением по размерам или ионообменные колонки также использовались для удаления загрязняющих веществ [31].

Для снижения стоимости и исключения центрифугирования предложен метод извлечения геномной ДНК из светлого сгустка крови после лизиса с помощью одноразового фильтрующего элемента с полиэфирсульфоновой мембраной (Millipore), крепящегося к шприцу [62]. К лизату клеток добавляют 100 % этанол, перемешивают и пропускают через фильтрующий элемент, после чего дважды пропускают промывающий буфер (2 М GuSCN, 60 % этанол), дважды 70 % этанол и 1 мл 100 % этанола. Мембрану удаляют и после высущивания (5 мин) помещают в пробирку, добавляют Трис-буфер и инкубируют в течение 2 ч для элюирования ДНК. Стоимость обработки, включая стоимость всех реагентов, оценивается авторами разработки в 0.25 \$, что на порядок меньше стоимости набора QIAamp Blood Mini Kit (Qiagen) (2.30–3.00 \$). При этом выход и качество ДНК, полученной с помощью набора и фильт-

рующего элемента, похожи, как и время ручного манипулирования (15 мин) [62]. Однако, как следует из приведенного протокола, вся процедура является длительной.

Варианты применения целлюлозы и ее производных в качестве материалов колонок для очистки НК описаны в работе [78], однако принципиально новый и простой подход предложен в работе [79]. Эти авторы разработали методологию "dipstick" (погружаемой полоски), позволяющую получать амплифицируемые ДНК и РНК из растительных, животных и микробных клеток за время менее 30 с. Исследованные полоски изготовлены из бумаги Whatman No 1, но, по мнению авторов разработки, могут применяться и обычные бумажные полотенца. В работе указаны основные преимущества целлюлозной бумаги: способность быстро адсорбировать относительно большие количества ДНК и/или РНК с помощью капиллярных сил, причем НК захватываются или связываются волокнами целлюлозы. Кроме того, достаточные количества НК удерживаются на целлюлозе даже после длительного выдерживании в большом объеме воды, тогда как ингибиторы быстро вымываются, и, наконец, целлюлоза позволяет быстро элюировать достаточные количества НК прямо в смесь для амплификации. Простота, быстрота, дешевизна и отсутствие необходимости в оборудовании позволят применять эту технологию в полевых условиях, в учреждениях с ограниченными ресурсами и в развивающихся странах, увеличивая доступность методов молекулярной биологии [79]. Стоимость метода обработки одного образца, включая реагенты и пластиковые изделия, оценена в 0.15 \$, причем основной вклад в стоимость вносят шариковые подшипники, использованные для гомогенизации проб, и при их многократном использовании стоимость уменьшается до 0.06 \$ на образец. В работе указано, однако, что для проведения полного анализа в полевых условиях необходимо сопряжение предложенной технологии с технологией изотермической амплификации в портативном варианте с визуальной регистрацией результатов.

Здесь следует отметить, что одним из успешных вариантов приготовления и сохранения НК является быстрая технология для анализа НК — так называемые ФТА-карты (Fast Technology for Analysis of nucleic acids), уже выпускаемых рядом компаний. Технология Whatman позволила разработать карты из целлюлозной бумаги, импрегнированной химическими реагентами, которые лизируют клетки, денатурируют белки, дезактивируют бактерии и вирусы и защищают ДНК от нуклеаз, окисления и УФ-повреждения, что позволяет собирать и хранить биологический материал при комнатной температуре одновременно с экстрак-

цией ДНК [34]. В работе этих авторов приведено очень подробное описание применения и вариантов ФТА-карт, указаны основные поставщики, достоинства и ограничения их применения, поэтому в данном обзоре они не рассматриваются.

4.4. Методы очистки ДНК с помощью магнитных сфер

4.4.1. Общие положения

Одной из уже ставших традиционными технологий является очистка НК магнитными частицами (МЧ), в которой магнитные свойства частиц, адсорбирующих НК, используют для отделения НК от загрязняющих веществ, присутствующих в растворе, лизате или в суспензии клеток. В настоящее время для очистки ДНК выпускают множество МЧ из разных материалов, включая, например, пористое стекло (MGP), целлюлозу (MagaZorb[®]), двуокись кремния SiO₂ (GenoPrep[™] DNA), полистирол (Dynabeads[®] DNA), неорганические магнитные материалы, подобные окиси железа с модифицированной поверхностью (MagneSil, SiMAG) и т.п. [34]. Кроме того, для увеличения сродства к нужной НК используют МЧ с иммобилизованными аффинными лигандами или изготовленные из биополимера [28, 29].

Первые стадии метода подобны другим способам очистки и включают лизис клеток детергентами, литическими ферментами и/или физическими методами, после чего добавляют МЧ, связывающие высвобожденную ДНК. Применение магнита, который в случае ручных стадий просто прижимают к внешней стенке сосуда/пробирки с лизатом, позволяет собрать частицы с адсорбированной НК на стенке и удалить пипеткой вместе с лизатом почти все загрязняющие вещества, а затем выполнить серию стадий промывания и элюирования выделенной очищенной НК (при выполнении каждой стадии частицы последовательно суспендируются в добавляемом растворе, собираются с помощью магнита и затем суспендируются в следующем растворе). Полное выделение МЧ из жидкости обычно происходит в течение секунд или минут после размещения магнита (в зависимости от концентрации частиц и объема суспензии), однако действие магнита не должно быть излишне долгим, т.к. МЧ могут собираться в виде плотных упаковок, что потенциально приводит к образованию агрегатов [80].

В некоторых случаях МЧ могут не мешать последующему применению (например, ПЦР анализу), тогда стадию элюирования можно не использовать. Так, еще в 1990-х гг. разработан коммерческий набор Dynabeads[®] DNA DIRECT[™] (DynaL A.S., Норвегия) на основе монодисперсных магнитных сфер для быстрого выделения ДНК из крови, культур клеток и костного мозга за время

менее 10 мин [81, 82]. После промывания комплекс Dynabeads DNA мог быть использован прямо в ПЦР, т.к. первоначальная стадия нагревания достаточна для высвобождения ДНК, однако при выделении из крови, разбавленной в 100 раз и более, перед ПЦР была необходима стадия элюирования [82]. В работе [81] тестировали применимость системы для разнообразных организмов (бактерий, грибов, водорослей и т.п.) и тканей с целью создания общего подхода к очистке ДНК, пригодной для ПЦР. Для ряда тестируемых бактерий выход ДНК составлял 20–100 % относительно выделения в стандартной системе фенол—хлороформ, тогда как в других случаях выходы ДНК эквивалентны стандартному методу [81].

В последующие годы появилось большое количество публикаций, в которых описывались методы синтеза МЧ, модификации поверхностей, особенности протоколов очистки ДНК, выделяемой из разных сред, результаты сравнения наборов от разных производителей и с другими методами. В рамках данного обзора мы ограничимся некоторыми отдельными примерами таких работ, которые посвящены разным типам образцов и магнитных сфер, и в которых можно найти подробную библиографию по каждому из рассматриваемых в этих работах вопросов.

4.4.2. Очистка ДНК из клинических образцов

Доказательства применимости силикатных МЧ KingFisher в сочетании с роботизированным процессором KingFisher ML (ThermoLifeSciences) для извлечения свободной ДНК из плазмы крови приведены в работе [83]. При обсуждении использования методов экстракции и очистки в судебных анализах авторы [84] сообщают, что при сравнении колоночных и магнитных методов последние имеют преимущества. В отличие от колонок с SiO_2 МЧ позволяют легко выполнить процедуру очистки, что приводит к высокой производительности экстракции на роботизированных платформах, и, кроме того, МЧ применимы к различным типам образцов, включая кровь, слюну и сперму с маленьким перекрестным загрязнением. Отмечено также, что автоматизированные методы на основе МЧ дают низкие уровни ингибиторов ПЦР, извлекающихся с ДНК, по сравнению с ручной органической экстракцией и, кроме того, сильно деградированная ДНК легче связывается с магнитными сферами, чем с поверхностью SiO_2 в колонках [84].

В работе [85] показана возможность применения МЧ на основе мочевино-формальдегидной смолы для извлечения геномной ДНК из различных типов образцов крови (свежей, криоконсервированной и высушенной) с результатами, превосходящими традиционный метод (экстракцию в системе фенол—хлороформ) и коммерческие наборы. Авторы [85] указывают, что приготовленные

МЧ имеют сильный магнитный отклик, хорошую устойчивость, однородное распределение по размерам и большую удельную площадь поверхности при меньшей стоимости. В то же время отмечается, что хотя и существует потенциальная возможность применения таких частиц для выделения ДНК из крови с высокой производительностью, приготовление частиц в большом масштабе и оптимизация их характеристик потребует дополнительного времени и затрат.

Изучена адсорбция фрагментов ДНК (700 п.о.) из модельных растворов магнитными частицами с разными модификаторами поверхности — SiO_2 , фосфатами, поливинилпирролидоном (ПВП), триполифосфатом — и результаты количественного ПЦР-анализа ДНК, выделенной на МЧ, сопоставлены с изменением характеристик частиц (дзета-потенциала и размера) [86]. Показано, что детектируемые количества сильно отличаются, составляя (в процентах от общего количества ДНК) 0.1 % для фосфата, 0.6 % для SiO_2 , 76.5 % для триполифосфата и 166.9 % для ПВП. Во всех случаях, кроме фосфатного покрытия, дзета-потенциал уменьшался до нуля, однако значительные изменения обоих параметров (уменьшение дзета-потенциала до отрицательных значений и почти двукратное увеличение размера частиц) наблюдалось только в случае покрытия триполифосфатом.

Целью работы [87] было создать универсальный подход для выделения геномной ДНК с помощью магнитных наночастиц (≤ 100 нм), к преимуществам которых относят большую поверхность и устойчивость в виде коллоидных суспензий при комнатной температуре, позволяющую однородно распределять их в реакционной смеси. Процедура занимает менее 15 мин, и конечный продукт пригоден для ПЦР-амплификации. Выход ДНК из лизатов крови, гомогенатов тканей и культивированных клеток в среднем эквивалентен или несколько выше, чем в случае традиционных методов (в системе фенол—хлороформ и Qiagen колонке со стекловолокном).

Показана возможность синтеза и применения наночастиц с покрытием аминокислотными группами для выделения ДНК из лизата клеток дрожжей [88]. Успешность клинического использования магнитных наночастиц (Nanotechnology Development Co., Ltd, China) продемонстрирована при выделении ДНК из слюны больных ишемическим инсультом для генотипирования [89]. Авторы оценивают этот метод как недорогой, надежный и точный, простой и быстрый (очистка ДНК занимает ≤ 40 мин для 10 образцов), требующий только 5 легких в выполнении стадий и не требующий сложного оборудования или знания биохимии.

Экстракция ДНК выполнена из сухих пятен крови с использованием модифицированного бу-

фера и суперпарамагнитных частиц компании LGC Genomic (ранее AGOWA, Germany) [90]. Сделан вывод, что метод надежен, эффективен и может быть принят для целей генетической диагностики. Метод на основе суперпарамагнитных частиц (SPION) применен для выделения ДНК *M. tuberculosis* из мокроты и охарактеризован как быстрый, недорогой, проводимый в одной пробирке, причем выделенная ДНК является чистой и пригодна для ПЦР-РВ [91]. Время выполнения анализа / стоимость одного теста составляет: для SPION метода 35 мин / 0.25 \$; для экстракции в системе хлороформ—фенол 6 ч / 0.5 \$; для методов на основе магнитных сфер 45 мин / 1.4 \$. Преимуществом суперпарамагнитных частиц является невзаимодействие друг с другом в отсутствие магнитного поля, поэтому устраняется слипание частиц и их агрегация и достигается легкое ресуспендирование частиц при переходе от стадии к стадии [29].

Разработан простой и быстрый (<10 мин) метод получения сверхчистой сверхсвернутой плазмидной ДНК с высоким выходом из бактериальных культур с использованием суперпарамагнитных наночастиц Fe_3O_4 , поверхность которых модифицирована полиэтиленгликолем [Chiang et al., 2005]. Качество выделения и очистки ДНК этим методом, а также легкость выполнения превосходят характеристики метода на основе традиционных анионообменных смол [92]. Описано получение магнитных наночастиц с покрытием полиэтиленгликолем, оценены их характеристики по извлечению из растворов чистых плазмид и геномной ДНК и изучено выделение ДНК из лизатов бактериальных культур и крови [93]. Обнаруженные проблемы, заключающиеся в трудности элюирования ДНК, решены введением в элюирующий буфер формамида (5 % для плазмид, 10 % для геномной ДНК) и нагреванием до 60 °С.

О применимости наночастиц магнетит- SiO_2 (~15 нм) для выделения сверхчистой плазмидной ДНК сообщается в работе [94]: авторы описывают метод синтеза частиц и оптимизацию процесса очистки ДНК из лизатов культивированных клеток *E. coli*. Изложен метод получения наночастиц $Fe_3O_4-SiO_2$ (≤ 20 нм) и обсуждается их применение для выделения и очистки ДНК вирусов гепатита В и Эпштейна—Барра из реальных образцов сыворотки [95]. Результаты свидетельствуют, что такие частицы обеспечивают большую чувствительность ПЦР-анализа и требуют меньше времени для выделения ДНК, чем коммерческие МЧ, покрытые SiO_2 (Dynabeads MyOne Silane, Life Technologies).

Суперпарамагнитные частицы магнетит- SiO_2 (~200 нм) предложено применять не только при очистке, но и для быстрой недорогой количественной оценки ДНК с помощью визуальной опре-

деляемой агрегации, которая происходит при хаотропных условиях во вращающемся магнитном поле [96]. Однако при практическом применении выяснено, что в результате ферментного лизиса мазков изо рта и последующей инактивации фермента при 95 °С эффективной агрегации не происходит, поэтому количественное определение ДНК следует выполнять до стадии дезактивации фермента (при 75 °С).

Магнитные сферы позволяли эффективно решить многие проблемы, возникающие при необходимости выделить НК, а общедоступные протоколы их применения были ограничены, поэтому в работе [97] изложены пошаговые инструкции по легкому синтезу магнитных сфер с покрытием в виде SiO_2 или карбоксильных групп. Кроме того, приводятся подробные протоколы по их использованию при очистке плазмид, геномной ДНК, РНК и общих НК из многообразных бактериальных, животных, растительных образцов и образцов окружающей среды. Как сообщают указанные авторы, для дополнительной информации и обсуждения методов можно обратиться на веб-страницу (<https://bomb.bio>).

4.4.3. Модифицирование процедур на основе МЧ

Несмотря на многие преимущества, протоколы ручных методов очистки являются длительными, включают множество стадий и недешевы из-за больших количеств расходных материалов: требуется от 3 до 7 промываний в зависимости от сложности исходного материала (т.е. меньше стадий промывания для образцов мочи и больше для цельной крови) [98]. Для упрощения и удешевления процедуры очистки предложено заменить множество стадий промывания однократным прохождением МЧ из раствора лизата, в котором происходит сорбция НК, в элюирующий буфер через гидрофобную жидкость, действующую как барьер для мешающих веществ и предотвращающую смешивание растворов [98]. Перенос МЧ между лунками выполняли в специально разработанном картридже с внешним магнитным полем. Этот процесс выполнен в цельной крови, плазме и моче и позволил получить ДНК и РНК настолько же чистые, как и после стадий интенсивного промывания [98]. Предполагается, что перемещение МЧ вместо перемещения жидкостей упростит приборные средства, уменьшит количество расходных материалов и сократит время.

При дальнейшем развитии этой концепции создана платформа в виде массива лунок для имитации конфигураций 384- и 1536-луночных микротитрационных планшетов, в которой миниустройство состоит из 3 лунок в линейной конфигурации, соединенных двумя микрофлюидными каналами [99]. Лунки заполняют соответственно суспензией клеток, лизирующим буфером и МЧ, несмешиваемой агрегации, которая происходит при хаотропных условиях во вращающемся магнитном поле [96]. Однако при практическом применении выяснено, что в результате ферментного лизиса мазков изо рта и последующей инактивации фермента при 95 °С эффективной агрегации не происходит, поэтому количественное определение ДНК следует выполнять до стадии дезактивации фермента (при 75 °С).

вающейся жидкостью, формирующей стабильные межфазные поверхности, и, наконец, элюирующим буфером и с помощью магнита перемещают НК, связанные с МЧ, через границы фаз в элюирующий буфер. Эффективности амплификации НК после очистки составили 90–110 % для множества генов, указывая на успешность отделения НК от ингибиторов ПЦР, причем выход и чистота НК сравнимы или лучше, чем в случае коммерческих наборов, при уменьшении времени процесса от 15–45 мин до менее 5 мин [99].

Очень подробное изучение и оптимизация процесса выделения ДНК из мочи на магнитных сферах с покрытием SiO₂ (Dynabeads[®] MyOne™ Silane magnetic beads, Life Technologies) выполнено авторами [100], которые выявили основные параметры процесса, влияющие на эффективность, и предложили оригинальный свой вариант выполнения. По этому варианту пробу вводили в соответствующий буфер, помещенный вместе с магнитными сферами в шарик пипетки для переноса жидкостей, где и происходила адсорбция. Далее выдавливали частицы с адсорбированной ДНК в самодельный картридж в виде трубки небольшого диаметра, содержащей растворы для промывания и элюирования, разделенные воздушными зазорами, и перемещали МЧ через растворы с помощью магнита, что позволило избежать множества стадий пипетирования и точного переноса объемов жидкостей. Экстракцию выполняли за ~15 мин при стоимости реагентов менее 1 \$ на экстракцию.

При магнитной сепарации НК могут использоваться и другие технические решения, облегчающие и/или ускоряющие процесс очистки. Например, в технологии Magtration[®] (Precision System Science Co, Ltd., Japan) применяют специальный реагент с МЧ, помещаемый в одноразовые наконечники пипеток, что позволяет безопасно, быстро и эффективно извлекать НК из крови, сыворотки, плазмы, мочи и мазков (по описанию производителя).

Основными проблемами при использовании магнитных частиц, по мнению авторов [101], является вероятность образования очень плотного сгустка МЧ под действием одного магнита, что затрудняет ресуспендирование, а кроме того, недостаточная эффективность и большая длительность извлечения целевых соединений при работе с очень вязкими средами. Для устранения недостатков предложено применять систему из двух магнитов во вращающейся трубчатой конфигурации системы анализа. Приведено подробное описание конструкции, численное моделирование и модельные эксперименты с использованием белков с флуоресцентной меткой и реальных биожидкостей (крови, мокроты, сыворотки и слюны). Показано, что в системе с двумя магнитами достигается

2.5-кратное улучшение захвата биомаркера в исследованных образцах меньшей вязкости и 20 %-е увеличение количества захваченного маркера при высокой вязкости образцов (по сравнению с системой с одним магнитом).

В работе [76] фокусированное ультразвуковое поле 2.65 МГц применено одновременно и для удерживания магнитных частиц (ЗАО "Синтол") во взвешенном состоянии в поле стоячей волны, и для неконтактного перемешивания пробы, вызываемого акустическими течениями. Изучено влияние интенсивности поля на выход и целостность плазмидной ДНК *M. tuberculosis* из модельных растворов и показано, что при оптимальных условиях выделение ДНК происходит в 2 раза эффективнее, чем в отсутствие ультразвука, достигая 82 %. При интенсивности поля 3.0 Вт/см² происходит разрушение плазмиды, если озвучивание продолжается более 1 мин. Сочетание магнитного и ультразвукового поля использовано для концентрирования ДНК из модельных растворов в динамическом режиме на суспензионной колонке с магнитными наночастицами Fe₃O₄, покрытыми SiO₂ [102]. Ультразвуковое поле позволяет удерживать суспензию частиц в колонке в условиях потока, а магнит в верхней части колонки служит в качестве магнитного фильтра, предотвращая вымывание мелких частиц. Извлечение плазмидной ДНК *M. tuberculosis* концентрации 1000 копий/мл из водопроводной воды и водных экстрактов почв в проточном режиме позволило в 20–27 раз увеличить выход ДНК по сравнению со стационарным режимом.

4.4.4. Преимущества и недостатки метода

Преимуществом применения МЧ является отсутствие стадий центрифугирования, которое может создавать сдвиговые силы и вызывать разрушение НК, удлиняет процедуру и затрудняет автоматизацию процесса очистки [32]. Процедуры с МЧ фактически не требуют оборудования и относительно легко выполняются, причем образцы можно обрабатывать в одной лунке с помощью повторного образования сгустков МЧ, удаления жидкости и добавления промывающего раствора [32]. К преимуществам относят также: большую емкость сорбента; минимизацию потерь по сравнению с жидкофазными методами и осаждением; снижение риска перекрестной контаминации, т.к. все (или почти все) НК связываются сорбентом; возможность масштабирования и высокую чистоту конечного продукта [45, 103].

Для ручных методов можно применять наборы с минимумом оборудования, например ChargeSwitch (Life Technologies), MagaZorb (Promega), QuickPick (Bio-Nobule) со сферами с ионообменными лигандами или парамагнитными частицами и отсутствием такого недостатка, как забивание

колонок при работе со сложными образцами [7]. Метод считается удобным, технологичным и пригодным для подготовки образца к амплификации, и его можно воспроизвести на роботизированных рабочих станциях [29].

Технология очистки ДНК магнитными сферами доступна и в варианте автоматизированной экстракции с применением специального оборудования, позволяя анализировать большое количество образцов, сберегая время и минимизируя возможные ошибки оператора, уменьшая трудоемкость и требования к обучению персонала [Barbosa et al., 2016]. Примерами автоматизированных систем являются MagNA Pure 96 System (www.roche-applied-science.com), AutoMate Express™ Instrument, Liferiver™ EX2400/EX4800 Automated Nucleic Acid Extraction System, Maxwell® 16 Instrument (<https://worldwide.promega.com>) и т.п. [34]. Производители сообщают протокол, специфичный для некоторых типов образцов, и поставляют соответствующие реагенты — это увеличивает стандартизацию и воспроизводимость.

К системам малой лабораторной автоматизации с парамагнитными сферами, относят NucliSens easyMAG (bioMérieux), EZ1 (Qiagen), MagNA Pure Systems (Roche); в системе Maxwell (Promega) используют целлюлозные парамагнитные сферы с промыванием этанолом [7]. Примерами большой лабораторной автоматизации (96 образцов) являются система QIA Symphony (Qiagen) с парамагнитными сферами и открытая система KingFisher (Thermo Sci.), в которой способ лизиса выбирает пользователь; системы GeneXpert (Cepheid) и FilmArray (BioFire) относятся к полностью автоматизированным системам с последующим анализом [7].

В то же время не следует забывать о ряде проблем, возникающих при работе с МЧ, на которые указано в ряде работ [29, 65, 81, 97, 104]. В лизате клеток присутствуют компоненты лизирующих буферов и самих клеток, мешающие амплификации, которые прилипают к поверхностям пробирки, захватываются агрегатами МЧ, образуясь под действием магнитного поля, или сохраняются в остаточном объеме после удаления супернатанта. Больше промываний требуется при очистке НК из сложных биологических матриц, таких как плазма и кровь, т.к. вязкость образца увеличивается при лизисе клеток, затрудняя полное удаление жидкости. Необходимость однородно распределять частицы на всех стадиях очистки ограничивает используемые объемы, а особенности клинических образцов (например, вязкость) могут приводить к недостаточной эффективности концентрирования частиц с помощью магнита; кроме того, мелкие частицы SiO₂ могут отламываться от сфер в процессе экстракции, теряя свою намагничен-

ность и загрязняя конечный образец [65]. Тенденция МЧ агрегировать уменьшает способность к связыванию целевых аналитов. Возможны потери продукта вследствие необратимой сорбции на частицах, а также в процессе многочисленных отмывок, что имеет особенно большое значение при работе с небольшими количествами ДНК в образце [29]. Следует помнить также о том, что перегрузка сфер образцом приводит к уменьшенной чистоте ДНК и в некоторых случаях к эффекту ингибирования ПЦР.

По мнению ряда авторов [34, 104] основным недостатком является высокая стоимость, особенно в случае автоматизированных систем. Существующие наборы и приборы (устройства) для приготовления образцов от компаний, таких как Invitrogen, Roche, Qiagen и bioMérieux стоят в диапазоне от 15 000 до 80 000 \$ [104]. Кроме того, автоматизированные системы являются менее регулируемой техникой, ограничивая возможность оптимизации экспериментов (изменения реагентов или внесения изменений в процесс), т.к. программируемый протокол нельзя модифицировать или остановить после того, как он начат [34].

4.5. Выделение и очистка ДНК с помощью смолы Chelex

Помимо твердофазных способов очистки, основанных на адсорбции ДНК и вымывании примесей, существуют методы, в которых используется противоположный принцип — применение хелатирующих ионообменных смол типа Chelex 100 для сорбции примесей, мешающих ПЦР-анализу [29, 32, 36, 103]. Смола Chelex является сополимером стирола с дивинилбензолом, содержащим иминодиацетатные группы, связывающие поливалентные ионы металлов, и относится к одному из старейших методов очистки ДНК. Методика применения Chelex включает чаще всего введение смолы (5 %, вес/объем) и инкубацию при нагревании (56 °С, 30 мин) и/или кипячение, после чего супернатант, содержащий ДНК, отделяют центрифугированием [103]. Смола связывает ионы Ca²⁺ и Mg²⁺, деактивируя нежелательные нуклеазы и таким образом предотвращая деградацию ДНК [84].

В отношении эффективности метода Chelex существуют различающиеся оценки. В ряде работ сообщают об успешном применении этого метода, хотя в то же время наблюдается тенденция к модифицированию протокола и/или его замены на твердофазные ручные и/или автоматические методы.

Лизис кипячением маленького объема клеток крови и связывание ингибиторов смолкой Chelex в течение 30 мин относят к простым методам;

причем удаление ингибиторов при добавлении к образцу Chelex (например, InstaGene Matrix, Bio-Rad) и отделении супернатанта, содержащего НК, иногда является всем, что требуется [7]. В самой ранней работе [105] разработаны процедуры с использованием Chelex 100 для экстракции ДНК из образцов судебного типа для ПЦР. В качестве достоинств авторы методики отмечают простоту, быстроту, отсутствие переноса пробирок и органических растворителей, а также то, что экстракция ДНК из спермы и маленьких пятен крови является не менее эффективной, чем в системе фенол—хлороформ. Вывод о возможности и предпочтительности применения кипячения проб с Chelex 100 (8 мин) для получения амплифицируемой ДНК из парафинированных тканей сделан в работе [106]. Сравнение результатов диагностической ПЦР показало, что при обработке фильтровальной бумаги, импрегнированной кровью, метод Chelex в 10 раз быстрее и в 20 раз дешевле, чем в случае коммерческого набора QIAamp blood kit (Qiagen) при соизмеримом качестве полученной ДНК [107].

Оценка эффективности трех методов экстракции ДНК — ручных методов Chelex[®] 100, Qiagen DNA Investigator Kit и автоматизированного метода (QIAcube robot) — из клеток ротовой полости и мазков крови с помощью ПЦР-РВ привела к выводу, что между результатами нет разницы, однако автоматизированный метод был проще и быстрее [108]. В работе [109] указано, что метод Chelex[®] широко использовали в судебных лабораториях вследствие его простоты и эффективности. При сравнении характеристик метода Chelex и двух коммерческих наборов при анализе образцов крови, спермы и слюны показано, что для лабораторий с низкой производительностью ручной метод с Chelex[®] пригоден для выделения ДНК, но может потребовать дополнительной очистки при содержании в образцах некоторых ингибиторов. Отмечено также, что метод Chelex[®] является много более дешевой альтернативой, обеспечивающей приемлемый выход ДНК, и на практике редко страдает от ингибирования в рутинных условиях судебных лабораторий. Поскольку ДНК, остающаяся на месте криминальных происшествий, часто ограничена в количестве и далека от чистоты, в работе [110] тестировали 5 методов для оценки качества профилирования ДНК при извлечении из крови, светлого кровавого сгустка и образцов ДНК, моделирующих прикосновения. Предложен дифференцированный подход к выбору метода — в зависимости от особенностей образцов — и сделан вывод, что метод Chelex может применяться для анализа мазков из ротовой полости с известной идентичностью (из-за меньшей стоимости).

Метод Chelex применяли не только в судебных исследованиях; например, сообщалось о его использовании при анализе крови на *Plasmodium*, для извлечения ДНК из экстрактов дрожжевых клеток, а также для обработки образцов крови при идентификации *M. avium* методом ПЦР [111]. Разработан протокол для быстрого детектирования *Vibrio harveyi* методом ПЦР-РВ в 1 мл морской воды с помощью хелатирующей смолы (Sigma, USA) с пределом детектирования 6.0×10^1 CFU/мл [112]. Показана предпочтительность метода Chelex для экстракции ДНК из комаров, переносящих малярию, перед ПЦР в учреждениях с ограниченными ресурсами и затруднениями в снабжении реагентами [113]. При сравнении метода Chelex 100 и набора NucleoSpin[®] Blood and Tissue Kit при выделении ДНК из тканей животных сделан вывод о пригодности протокола с Chelex, позволившего получить большее количество ДНК, но степень чистоты была меньше, чем в случае набора [114]. При сравнении четырех методов экстракции при детектировании ДНК *M. leprae* из слайдов для микроскопии с разной бактериальной нагрузкой метод Chelex во всех случаях дал наибольший выход ДНК [115]. По результатам амплификации метод сопоставим с набором Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega), но в 2 раза хуже экстракции в системе фенол—хлороформ и в 2.5 раза хуже набора QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen). В недавней работе [116] сообщается, что из 6 методов ручной экстракции при извлечении ДНК *M. tuberculosis* из мокроты метод Chelex[®] показал лучшую эффективность, причем ПЦР-РВ детектирование подтвердило почти полное отсутствие ПЦР-ингибиторов. По мнению этих авторов метод быстр, надежен, воспроизводим и менее трудоемок, чем протокол с химическими реагентами и ферментами, а всю процедуру можно провести в одной пробирке, уменьшая риск загрязнения. При этом стоимость Chelex[®]-метода незначительна по сравнению с коммерческими методами на основе SiO₂—колонка или магнитных сфер, стоящими от 2 до 6 \$ на тест, что делает его особенно полезным для учреждений (стран) с низким уровнем дохода. В то же время в работе [117] указывается, что очистка с помощью Chelex[®] страдает от основного недостатка в виде неизбежного разбавления пробы, что может приводить к меньшей эффективности, в отличие от методов с колонками и магнитными частицами, концентрирующих ДНК при элюировании в маленький объем.

Общие преимущества и недостатки метода Chelex[®] суммированы в работах [32, 103]. Метод быстр, имеет мало стадий и в нем не используют опасные химические реагенты [32]. Преимуществами являются также безопасность, простота, возможность автоматизации, дешевизна, минимум

расходных материалов, возможность использования для всех типов объектов (кроме кости) и доступность для любой лаборатории [103]. К недостаткам относят неэффективное удаление ПЦР-ингибиторов из сложных образцов и неприменимость для анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов, т.к. высокая температура и щелочность в протоколе приводят к денатурации и получению одноцепочечной ДНК [32, 103]. Кроме того, на выходе получают неочищенную ДНК с варьированием количества и качества от образца к образцу, существует высокая вероятность ингибирования ПЦР самими смолами и потенциальная деградация ДНК со временем [103].

Работы по модификации метода с расширением областей применения и улучшением характеристик проводят из-за сформировавшегося мнения о недостаточной эффективности удаления примесей. В одной из работ [118] для быстрого извлечения бактериальной ДНК использовали комбинированный метод, включающий обработку лизатов клеток лактобактерий смолой Chelex в микроволновой печи. За время менее 20 мин можно было извлечь в 2–3 раза больше более чистой ДНК, чем при классическом методе СТАВ—фенол—хлороформ—изоамиловый спирт. Об успешности применения Chelex для идентификации микробных сообществ на скорлупе яиц сообщается в работе [119]. В предположении о возможной недостаточной эффективности удаления всех ингибиторов эти авторы ввели ряд изменений в протокол перед ПЦР-амплификацией: разбавление проб ДНК (1:10) и добавки бычьего сывороточного альбумина в ПЦР-смесь. Для улучшения метода в недавней работе [120] при извлечении ДНК из ткани и крови перед ПЦР применили многоступенчатую процедуру: двукратное кипячение суспензии Chelex с образцом, чередуемое с обработкой на вортексе, центрифугирование, удаление белков ацетатами и осаждение ДНК этанолом. К достоинству варианта авторы [120] относят не только то, что метод дешевле наборов на основе SiO₂ и магнитных частиц и менее токсичен, чем органическая экстракция, но и многократное улучшение выхода и качества ДНК по сравнению с обычным вариантом. Модифицированный метод Chelex (с исключением стадии кипячения) при сравнении 7 методов экстракции малых количеств ДНК из мелких артроподов недавно признан наиболее успешным по большому количеству критериев по сравнению и с коммерческими наборами, и с обычным методом Chelex [121]. Авторы сообщают, что не наблюдали никакого упоминаемого в литературе загрязнения ДНК ингибиторами.

Похожий принцип извлечения примесей, мешающих ПЦР-амплификации, в виде одностадийного процесса реализован авторами [122]: по этой

схеме выделяемый (и очищаемый) биополимер проходит не удерживаясь через слой сорбента, а примеси эффективно удерживаются сорбентом. Показано, что кремнеземный сорбент, модифицированный комбинацией нанослоев фторопласта и полианилина, существенно снижает потери ДНК и обеспечивает большую чувствительность выявления ДНК *M. tuberculosis* из лизата мокроты по сравнению с автоматизированным многостадийным методом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время существует огромное количество вариантов протоколов для выделения и очистки НК из разных сред для последующего ПЦР-анализа, которые реализованы в виде коммерческих наборов, разрабатываются вновь или модифицируются на основе уже известных принципов. Причины такого многообразия вполне объективны: не существует и потенциально не может быть создано унифицированной процедуры, которая была бы одинаково эффективна при обработке бесчисленного количества типов образцов и объектов ПЦР-анализа и в условиях резко отличающихся инфраструктуры и финансирования лабораторий, применяющих методы молекулярной диагностики. Поэтому помимо увеличения разработок и исследований, направленных на автоматизацию со стратегией "образец на входе — результат на выходе", нельзя не отметить существующую тенденцию разработки "собственных" протоколов, направленных прежде всего на максимально возможное снижение стоимости процедур выделения при сохранении качества ДНК. В основном, но не исключительно, последнее относится к так называемым развивающимся странам.

Выбор конкретного метода экстракции и очистки ДНК по-прежнему остается трудной задачей, от решения которой зависит получение правильного и надежного результата ПЦР. При этом независимо от используемых средств каждому пользователю (исследователю) обязательно необходимо тестировать и оценивать применимость протокола (метода) в реальных условиях для каждого выбранного объекта анализа. В некоторой степени удивительно, что в качестве метода сравнения при оценке новых методов часто применяется один из старейших методов на основе системы фенол—хлороформ—изоамиловый спирт, до сих пор рассматриваемый как "золотой стандарт" в судебных лабораториях.

Нельзя не отметить и усилия, прилагаемые к разработке более простых, удобных и дешевых средств выделения и очистки ДНК, в том числе на основе применения новых современных материалов и новых технологических решений, но ус-

пешность предложенных вариантов еще предстоит выяснить на практике при использовании их для решения конкретных задач в реальных средах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hedman J., Knutsson R., Ansell R., et al. Pre-PCR processing in bioterrorism preparedness: improved diagnostic capabilities for laboratory response networks. *Biosecur. Bioterror*, 2013, vol. 11, suppl. 1, pp. S87–S101. DOI: 10.1089/bsp.2012.0090.
- Kralik P., Ricchi M.A. Basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: definitions, parameters, and everything // *Front. Microbiol.* 2017. Vol. 8: 108. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00108
- Бочкарев Е.Г., Денисова Т.С., Генерозов Э.В. и др. Генодиагностика во фтизиатрии. М.: 2000, 15 с.
- Doebler R.W., Erwin B., Hickerson A., et al. Continuous-flow, rapid lysis devices for biodefense nucleic acid diagnostic systems // *JALA*. 2009, June. P. 119–125. DOI: 10.1016/j.jala.2009.02.010
- Martzy R., Kolm C., Krska R. et al. Challenges and perspectives in the application of isothermal DNA amplification methods for food and water analysis // *Anal. Bioanal. Chem.* 2019. Vol. 411. P. 1695–1702. DOI: 10.1007/s00216-018-1553-1
- Rantakokko-Jalava K., Jalava J. Optimal DNA isolation method for detection of bacteria in clinical specimens by broad-range PCR // *J. Clin. Microbiol.* 2002. Vol. 40, no. 11. P. 4211–4217. DOI: 10.1128/JCM.40.11.4211-4217.2002
- Thatcher S.A. DNA/RNA Preparation for molecular detection // *Clin. Chem.* 2015. Vol. 61, no. 1. P. 89–99. DOI: 10.1373/clinchem.2014.221374
- Islam M.S., Aryasomayajula A., Selvaganapathy P.R. A review on macroscale and microscale cell lysis methods // *Micromachines*. 2017. Vol. 8, is. 3: 83. DOI: 10.3390/mi8030083
- Rudi K., Jakobsen K.S. Overview of DNA purification for nucleic acid-based diagnostics from environmental and clinical samples // *Methods in Molecular Biology*. 2006. Vol. 345. P. 23–35. DOI: 10.1385/1-59745-143-6:23
- Burden D. Guide to the Disruption of Biological Samples // *Random Primers*. 2012. Vol. 25, no. 12. P. 1–25. URL: https://opsdiagnostics.com/applications/homogenization_guide_download.htm
- Gibbons L.E., Brangs H.C.G., Burden D.W. Bead Beating: A Primer (OPS Diagnostics, LLC) // *Random Primers*. 2014, no. 12. URL: https://opsdiagnostics.com/notes/ranpri/OPSD_Bead_Beating_Primer_2014%20v1.pdf
- Elphinstone J., Griffiths B., Goddard M., Stockdale E. Soil biology and soil health health partnership. Project 3: Molecular approaches for routine soil-borne disease and soil health assessment – establishing the scope. Research Review. no. 91140002-03. BBRO, 2018. 37 p. URL: <https://cereals.ahdb.org.uk/media/1362039/91140002-final-report-03pdf.pdf>
- Bakken L.R., Frostegård A. Nucleic acid extraction from soil // *Nucleic acids and proteins in soil*. Eds. P. Nannipieri, K. Smalla. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2006. P. 49–73.
- Лопухов Л.В., Эйдельштейн М.В. Полимеразная цепная реакция в клинической микробиологической диагностике // *Клиническая микробиология и антимикробная терапия*. 2000. Т. 2, № 3. С. 96–106. URL: <https://cmac-journal.ru/publication/2000/3/cmacc-2000-t02-n3-p096/cmacc-2000-t02-n3-p096.pdf>
- Vanechoutte M., Van Eldere J. The possibilities and limitations of nucleic acid amplification technology in diagnostic microbiology // *J. Med. Microbiol.* 1997. Vol. 46. P. 188–194. DOI: 10.1099/00222615-46-3-188
- Hedman J., Rådström P. Overcoming inhibition in real-time diagnostic PCR // *Meth. Mol. Biol.* 2013. Vol. 943. P. 17–48. DOI: 10.1007/978-1-60327-353-4_2
- Schrader C., Schielke A., Ellerbroek L., Johne R. PCR inhibitors — occurrence, properties and removal // *J. Appl. Microbiol.* 2012. Vol. 113. P. 1014–1026. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x
- Wilson I.G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification // *Appl. Environ. Microbiology*. 1997. Vol. 63, no. 10. P. 3741–3751. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC168683/>
- Rådström P., Knutsson R., Wolffs P., et al. Pre-PCR processing: Strategies to generate PCR-compatible samples // *Mol. Biotechnol.* 2004. Vol. 26. P. 133–146. DOI: 10.1385/MB:26:2:133
- Bessetti J. An introduction to PCR inhibitors // *Promega Corporation. Profiles in DNA*. 2007. Vol. 10, is. 1. P. 9–10. URL: <https://www.promega.es/-/media/files/resources/profiles-in-dna/1001/an-introduction-to-pcr-inhibitors.pdf?la=es-es>
- Matheson C.D., Gurney C., Esau N., Lehto R. Assessing PCR inhibition from humic substances // *The open enzyme inhibition J.* 2010. Vol. 3. P. 38–45. DOI: 10.2174/1874940201003010038
- Demeke T., Jenkins G.R. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits // *Anal. Bioanal. Chem.* 2010. Vol. 396. P. 1977–1990. DOI: 10.1007/s00216-009-3150-9
- Hu Q., Liu Y., Yi S, Huang D. The effect of six common PCR inhibitors on DNA polymerase and DNA template // *Int. J. Forensic Sci. Pathol.* 2014. Vol. 2, no. 8. P. 1–4. DOI: 10.19070/2332-287X-1400017
- Sidstedt M., Jansson L., Nilsson E., et al. Humic substances cause fluorescence inhibition in real-time polymerase chain reaction // *Anal. Biochem.* 2015. Vol. 487. P. 30–37. DOI: 10.1016/j.ab.2015.07.002
- Sidstedt M., Hedman J., Romsos E.L., et al. Inhibition mechanisms of hemoglobin, immunoglobulin G, and whole blood in digital and real-time PCR // *Anal. Bioanal. Chem.* 2018. Vol. 410, is. 10. P. 2569–2583. DOI: 10.1007/s00216-018-0931-z
- Moore D.D., Chory J., Ribaldo R.K. Isolation and purification of large DNA restriction fragments from agarose gels // *Current Protocols in Immunology*. 1993. Vol. 8, is. 1. P. 10.5.1–10.5.12. DOI: 10.1002/0471142735.im1005s08

27. Moore E., Arnscheidt A., Krüger A., et al. Simplified protocols for the preparation of genomic DNA from bacterial cultures // *Molecular Microbial Ecology Manual*, 2nd Ed. 1.01: 2004. P. 3–18.
28. Tan S.C., Yiap B.C. DNA, RNA, and protein extraction: The past and the present // *J. Biomed. Biotechnol.* 2009. Vol. 2009. 574398. DOI: 10.1155/2009/574398
29. Антонова О.С., Корнева Н.А., Белов Ю.В., Курочкин В.Е. Эффективные методы выделения нуклеиновых кислот для проведения анализов в молекулярной биологии (Обзор) // *Научное приборостроение*. 2010. Т. 20, № 1. С. 3–9.
URL: <http://iairas.ru/mag/2010/full/Art1.pdf>
30. Palomo F.S., Celle Rivero M.G., Quiles M.G., et al. Comparison of DNA extraction protocols and molecular targets to diagnose tuberculous meningitis // *Tuberculosis Res. Treat.* 2017. Vol. 2017. 5089046. DOI: 10.1155/2017/5089046
31. Purdy K.J. Nucleic acid recovery from complex environmental samples // *Method Enzymol.* 2005. Vol. 397. P. 271–292. URL: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)97016-X](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)97016-X)
32. Ali N., de Cássia Pontello Rampazzo R., Costa A.D.T., Krieger M.A. Current Nucleic Acid Extraction Methods and Their Implications to Point-of-Care Diagnostics // *BioMed Research Int.* 2017. Vol. 2017. 9306564. DOI: 10.1155/2017/9306564
33. Chacon-Cortes D., Griffiths L. Methods for extracting genomic DNA from whole blood samples: current perspectives // *J. Biorepository Science for Applied Medicine*. 2014. Vol. 2. P. 1–9. DOI: 10.2147/BSAM.S46573
34. Barbosa C., Nogueira S., Gadanho M., Chaves S. DNA extraction: finding the most suitable method // *Molecular Microbial Diagnostic Methods: Pathways to Implementation for the Food and Water Industries*. Chapter 7. Elsevier Inc., 2016. P. 135–154.
35. Zaveri P., Patel R., Patel M., Patel M., Sarodia D., Munshi N.S. Modification of extraction method for community DNA isolation from salt affected compact wasterland soil samples // *MethodsX*. 2017. Vol. 4. P. 63–67. DOI: 10.1016/j.mex.2017.01.002
36. Lee S.B., Shewale J.G. DNA Extraction methods in forensic analysis // *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons, 2017. P. 1–18.
DOI: 10.1002/9780470027318.a1104m
37. Cheng H.-R., Jiang N. Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts // *Biotechnol. Lett.* 2006. Vol. 28, no. 1. P. 55–59. DOI: 10.1007/s10529-005-4688-z
38. Zhang R., Gong H.-Q., Zeng X. et al. A Microfluidic liquid phase nucleic acid purification chip to selectively isolate DNA or RNA from low copy/single bacterial cells in minute sample volume followed by direct on-chip quantitative PCR assay // *Anal. Chem.* 2013. Vol. 85, no. 3. P. 1484–1491. DOI: 10.1021/ac3026509
39. Chomczynski P., Mackey K., Drews R., Wilfinger W. DNAzol: A reagent for the rapid isolation of Genomic DNA // *BioTechniques*. 1997. Vol. 22, no. 3. P. 550–553. DOI: 10.2144/97223pf01
40. Rodriguez-Garcia A., Mares R.E., Muñoz P.L.A., et al. DNA extraction with DNAzol and LAMP, performed in a heating block as a simple procedure for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum specimens // *Methods and Protoc.* 2018. Vol. 1, is. 4. 37.
DOI: 10.3390/mps1040037
41. Ligozzi M., Fontana R. Isolation of total DNA from bacteria and yeast // *Afr. J. Biotechnol.* 2003. Vol. 2, no. 8. P. 251–253. DOI: 10.5897/AJB2003.000-1052
42. Kissoudi M., Samanidou V. Recent Advances in applications of ionic liquids in miniaturized microextraction techniques // *Molecules*. 2018. Vol. 23, is. 6. 1437. DOI: 10.3390/molecules23061437
43. Fuchs-Telka S., Fister S., Mester P.-J., et al. Hydrophobic ionic liquids for quantitative bacterial cell lysis with subsequent DNA quantification // *Anal. Bioanal. Chem.* 2017. Vol. 409, no. 6. P. 1503–1511. DOI: 10.1007/s00216-016-0112-x
44. Ведерников В.Е. Сравнительная характеристика способов экстракции нуклеиновых кислот // *Лаборатория*. 2012. № 4. С. 14–15. URL: <http://www.alkorbio.ru/download.php?d=84&is=doc>
45. Аукенов Н.Е., Масабаева М.П., Хасанова У.У. Выделение и очистка нуклеиновых кислот. Состояние проблемы на современном этапе // *Наука и здравоохранение*. 2014. № 1. С. 51–53.
46. Madhad V.J., Senthil K.P. The rapid & non-enzymatic isolation of DNA from the human peripheral whole blood suitable for genotyping // *Eur. J. Biotechnol. Biosci.* 2014. Vol. 1, is. 3. P. 1–16. URL: <http://www.biosciencejournals.com/vol1/issue3/26.html>
47. Sakyi S.A., Kumi B., Ephraim R.D., et al. Modified DNA extraction technique for use in resource-limiting setting: Comparison of salting out methods versus QIAamp blood mini kit // *Ann. Med. Health Sci. Res.* 2017. Vol. 7, is. 3. P. 131–136.
URL: <https://www.amhsr.org/articles/modified-dna-extraction-technique-for-use-in-resourcelimited-settings-comparison-of-salting-out-methods-versus-qiaamp-bl.pdf>
48. Al-Shuhaib M.B.S. A minimum requirements method to isolate large quantities of highly purified DNA from one drop of poultry blood // *J. Genetics*. 2018. Vol. 97. P. 87–94. DOI: 10.1007/s12041-018-0983-z
49. Wells D.A., Herron L.L. Automation of sample preparation for genomics // *LC·GC Europe*. 2002. Vol. 15, no. 11. P. 712–720.
50. Boom R., Sol C.J., Salimans M.M., et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids // *J. Clin. Microbiol.* 1990. Vol. 28, no. 3. P. 495–503. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC269651/pdf/jcm00051-0103.pdf>
51. Zähringer H. Don't lose the thread. Product survey: Manual DNA extraction kits // *Lab Times*. 2012. no. 6. P. 52–56.
52. Li J.-F., Li L., Sheen J. Protocol: a rapid and economical procedure for purification of plasmid or plant LNA with diverse applications in plant biology // *Plant Methods*. 2010. Vol. 6, is. 1. DOI: 10.1186/1746-4811-6-1
53. Huanca-Mamani W., Rivera-Cabello D., Maita-Maita J. A simple, fast and inexpensive CTAB-PVP-silica based method for genomic DNA isolation from single, small insect larvae and pupae // *Genetics and Molecular Res.*

2015. Vol. 14, no. 3. P. 8001–8007.
DOI: 10.4238/2015.July.17.8
54. Rohland N., Hofreiter M. Comparison and optimization of ancient DNA extraction // *BioTechniques*. 2007. Vol. 42. P. 343–352. DOI: 10.2144/000112383
 55. Devi S.G., Fathima A.A., Radha S. et al. A rapid and economical method for efficient DNA extraction from diverse soils suitable for metagenomic applications // *PLoS ONE*. 2015. Vol. 10, no. 7. e0132441.
DOI: 10.1371/journal.pone.0132441
 56. Wang X., Xing L., Shu Y., et al. Novel polymeric ionic liquid microspheres with high exchange capacity for fast extraction of plasmid DNA // *Anal. Chim. Acta*. 2014. Vol. 837. P. 64–69. DOI: 10.1016/j.aca.2014.06.002
 57. Shakhmaeva I.I., Bulatov E.R., Bondar O.V., et al. Binding and purification of plasmid DNA using multilayered carbon nanotubes // *J. Biotechnol.* 2011. Vol. 152, no. 3. P. 102–107. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2011.01.022
 58. Topçu A.A., Aşır S., Türkmen D. DNA purification by solid phase extraction (SPE) methods // *Hacettepe J. Biol. & Chem.* 2016. Vol. 44, is. 3. P. 259–266. URL: <http://www.hjbc.hacettepe.edu.tr/site/assets/files/4121/08-259-266.pdf>
 59. Nacham O., Clark K.D., Anderson J.L. Extraction and purification of DNA from complex biological sample matrices using solid-phase microextraction coupled with real-time PCR // *Anal. Chem.* 2016. Vol. 88. P. 7813–7820. URL: <https://pdfs.semanticscholar.org/093b/da2eddf068f83212b7517dcabe796d8c25f9.pdf>
 60. Holmberg R.C., Gindlesperger A., Stokes T., et al. Akonni TruTip® and Qiagen® methods for extraction of fetal circulating DNA — evaluation by real-time and digital PCR // *PLoS One*. 2013. Vol. 8, no. 8. e73068. DOI: 10.1371/journal.pone.0073068
 61. Frickmann H., Hinz R., Hagen R.M. Comparison of an automated nucleic acid extraction system with the column-based procedure // *Eur. J. Microbiol. Immunol.* 2015. Vol. 5, no. 1. P. 94–102. DOI: 10.1556/EUJMI-D-14-00040
 62. Mandal G., Das S., Padmanabhan S. Development of a membrane-based method for isolation of genomic DNA from human blood // *J. Biomol. Techniques*. 2018. Vol. 29, is. 3. P. 46–53. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5865945/>
 63. Beall S.G., Cantera J., Diaz M.H., et al. Performance and workflow assessment of six nucleic acid extraction technologies for use in resource limited settings // *PLoS ONE*. 2019. Vol. 14, no. 4. e0215753.
DOI: 10.1371/journal.pone.0215753
 64. Thakore N., Garber S., Bueno A., et al. A bench-top automated workstation for nucleic acid isolation from clinical sample types // *J. Microbiol. Methods*. 2018. Vol. 148. P. 174–180. DOI: 10.1016/j.mimet.2018.03.021
 65. Holmberg R.C., Gindlesperger A., Stokes T., et al. High-throughput, automated extraction of DNA and RNA from clinical samples using TruTip technology on common liquid handling robots // *J. Vis. Exp.* 2013. Vol. 76. e50356. DOI: 10.3791/50356
 66. Bag S., Saha B., Mehta O., et al. An improved method for high quality metagenomics DNA extraction from human and environmental samples // *Sci. Rep.* 2016. Vol. 6. 26775. DOI: 10.1038/srep26775
 67. Zhou Y., Zhang Y., He W., et al. Rapid regeneration and reuse of silica columns from PCR purification and gel extraction kits // *Sci. Rep.* 2018. Vol. 8. 12870. DOI: 10.1038/s41598-018-30316-w
 68. Shi R., Lewis R.S., Panthee D.R. Filter paper-based spin column method for cost-efficient DNA or RNA purification // *PLoS ONE*. 2018. Vol. 13, no. 12. e0203011. DOI: 10.1371/journal.pone.0203011
 69. Shipley M.A., Koehler J.W., Kulesh D.A., Minogue T.D. Comparison of nucleic acid extraction platforms for detection of select biothreat agents for use in clinical resource limited settings // *J. Microbiol. Methods*. 2012. Vol. 91, no. 1. P. 179–183. DOI: 10.1016/j.mimet.2012.06.008
 70. UNITAID. *Tuberculosis. Diagnostics technology landscape*. 5th edition. Geneva, 2017. 90 p. URL: <http://unitaid.org/assets/2017-Unitaid-TB-Diagnostics-Technology-Landscape.pdf>
 71. Thakore N., Norville R., Franke M., et al. Automated TruTip nucleic acid extraction and purification from raw sputum // *PLoS ONE*. 2018. Vol. 13, no. 7. e0199869. DOI: 10.1371/journal.pone.0199869
 72. Akonni Biosystems. Inc. TruTip® Automated Workstation. URL: <https://akonni.com/technology/sample-prep/>
 73. Poh J.-J., Gan K.-E. The determination of factors involved in column-based nucleic acid extraction and purification // *J. Bioprocess. Biotechnol.* 2014. Vol. 4, no. 3. 1000157. DOI: 10.4172/2155-9821.1000157
 74. Katevatis C., Fan A., Klapperich C.M. Low concentration DNA extraction and recovery using a silica solid phase // *PLOS One*. 2017. Vol. 12, no. 5. e0176848. DOI: 10.1371/journal.pone.0176848
 75. Петров Д.Г., Макарова Е.Д., Корнева Н.А., Альдекева А.С., Князьков Н.Н. Воздействие полей разной природы на выход ДНК при выделении из модельных растворов на двуокиси кремния. 1. Влияние температуры // *Научное приборостроение* 2015. Т. 25, № 2. С. 91–101. URL: <http://iairas.ru/mag/2015/full2/Art9.pdf>
 76. Петров Д.Г., Макарова Е.Д., Антифеев Н.Е. и др. Воздействие полей разной природы на выход ДНК при выделении из модельных растворов на двуокиси кремния. Влияние ультразвука // *Научное приборостроение* 2017. Т. 27, № 4. С. 40–55. URL: <http://iairas.ru/mag/2017/full4/Art6.pdf>
 77. Kathiravan M.N., Gim G.H., Ryu J., et al. Enhanced method for microbial community DNA extraction and purification from agricultural yellow loess soil // *J. Microbiol.* 2015. Vol. 53, no. 11. P. 767–775. DOI: 10.1007/s12275-015-5454-0
 78. Tan S.C., Ong C.E., Hay Y.K., Yiap B.C. Cellulose and its application in biomolecules purification // *Intl. Res. J. Appl. Basic Sci.* 2013. Vol. 7, no. 5. P. 267–276.
 79. Zou Y., Mason M.G., Wang Y. et al. Nucleic acid purification from plants, animals and microbes in under 30 seconds // *PLoS Biology*. 2017. Vol. 15, no. 11. e2003916. DOI: 10.1371/journal.pbio.2003916
 80. Bangs Laboratories, Inc. Magnetic microspheres. Tech-Note 102. URL:

- <https://www.bangslabs.com/sites/default/files/imce/docs/TechNote%20102%20Web.pdf>
81. Rudi K., Kroken M., Dahlberg O.J., et al. Rapid, universal method to isolate PCR-ready DNA using magnetic beads // *Bio Techniques*. 1997. Vol. 22, no. 3. P. 506–511. DOI: 10.2144/97223rr01
 82. Deggerdal A., Larsen F. Rapid isolation of PCR-ready DNA from blood, bone marrow and cultured cells, based on paramagnetic beads // *BioTechniques*. 1997. Vol. 22, no. 3. P. 554–557. DOI: 10.2144/97223pf02
 83. Stemmer C., Beau-Faller M., Pencreach E., et al. Use of magnetic beads for plasma cell-free DNA extraction: Toward automation of plasma DNA analysis for molecular diagnostics // *Clin. Chem*. 2003. Vol. 49, no. 11. P. 1953–1955.
 84. Romeika J.M., Yan F. Recent Advances in Forensic DNA Analysis // *J. Forensic Res*. 2013. S12. 001. 13 p. DOI: 10.4172/2157-7145.S12-001
 85. Gong R., Li S. Extraction of human genomic DNA from whole blood using a magnetic microsphere method // *Int. J. Nanomed*. 2014. Vol. 9. P. 3781–3789. DOI: 10.2147/IJN.S59545
 86. Haddad Y., Xhaxhiu K., Kopel P., et al. The isolation of DNA by polycharged magnetic particles: an analysis of the interaction by Zeta potential and particle size // *Int. J. Mol. Sci*. 2016. Vol. 17, is. 4. P. 550–561. DOI: 10.3390/ijms17040550
 87. Saiyed Z.M., Ramchand C.N., Telang S.D. Isolation of genomic DNA using magnetic nanoparticles as a solid-phase support // *J. Phys. Condens. Matter*. 2008. Vol. 20, no. 20. 204153. DOI: 10.1088/0953-8984/20/20/204153
 88. Niemirowicz K., Wilczewska A.Z., Car G. Magnetic nanoparticles as separators of nucleic acids // *Chemik*. 2013. Vol. 67, no. 10. P. 836–841.
 89. Yi L., Huang Y., Wu T., Wu J. A magnetic nanoparticles-based method for DNA extraction from the saliva of stroke patients // *Neural Regeneration Research*. 2013. Vol. 8, no. 32. P. 3036–3046. DOI: 10.3969/j.issn.1673-5374.2013.32.007
 90. Sirdah M.M. Superparamagnetic-bead based method: An effective DNA extraction from dried blood spots (DBS) for diagnostic PCR // *J. Clin. Diagn. Res*. 2014. Vol. 8, no. 4. P. FC01–FC04. DOI: 10.7860/JCDR/2014/8171.4226
 91. Sawant D.V., Bohara R.A., Patil R.S., Pawar S.H. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* from pulmonary sputum sample using SPION mediated DNA extraction method // *Res. J. Life Sci., Bioinformatics, Pharm. Chem. Sci. (RJLBPCS)*. 2018. Vol. 4, no. 1. P. 91–105. DOI: 10.26479/2018.0401.08
 92. Chiang C.L., Sung C.S., Wu T.F., et al. Application of superparamagnetic nanoparticles in purification of plasmid DNA from bacterial cells // *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci*. 2005. Vol. 822, no. 1-2. P. 54–60. DOI: 10.1016/j.jchromb.2005.05.017
 93. Danthararayana A.N., Manatunga D.C., de Silva R.M., et al. Magnetofection and isolation of DNA using polyethyleneimine functionalized magnetic iron oxide nanoparticles // *R. Soc. Open. Sci*. 2018. Vol. 5, is. 12. 181369. DOI: 10.1098/rsos.181369
 94. Volkova N.N., Derjabin O.N., Yanishpolskii V.V., Dudchenko N.O. Isolation of ultrapure plasmid DNA from bacterial cells with silica-magnetite nanoparticles // *Annales. Universitatis Mariae Curie-Skłodowska. Lublin – Polonia. Sectio AA*. 2007. Vol. LXII, no. 22. P. 250–260. URL: http://dlibra.umcs.lublin.pl/Content/24167/czas4051_62_2007_22.pdf
 95. Quy D.V., Hieu N.M., Tra P.T., et al. Synthesis of silica-coated magnetic nanoparticles and application in the detection of pathogenic viruses // *J. Nanomaterials*. 2013. Vol. 2013. 603940. (6 p.) DOI: 10.1155/2013/603940
 96. Liu Q., Li J., Liu H., et al. Rapid, cost-effective DNA quantification via a visually-detectable aggregation of superparamagnetic silica-magnetite nanoparticles // *Nano Research*. 2014. Vol. 7, no. 5. P. 755–784. DOI: 10.1007/s12274-014-0436-9
 97. Oberacker P., Stepper P., Bond D.M., et al. Bio-on-magnetic-beads (BOMB): Open platform for high-throughput nucleic acid extraction and manipulation // *PLoS Biol*. 2019. Vol. 17, no. 1. e3000107. DOI: 10.1371/journal.pbio.3000107
 98. Sur K., McFall S.M., Yeh E.T., et al. Immiscible phase nucleic acid purification eliminates PCR inhibitors with a single pass of paramagnetic particles through a hydrophobic liquid // *J. Mol. Diagnostics*. 2010. Vol. 12, no. 5. P. 620–628. DOI: 10.2353/jmoldx.2010.090190
 99. Berry S.M., Alarid E.T., Beebe D.J. One-step purification of nucleic acid for gene expression analysis via immiscible filtration assisted by surface tension (IFAST) // *Lab. Chip*. 2011. Vol. 11, no. 10. P. 1747–1753. DOI: 10.1039/c1lc00004g
 100. Bordelon H., Russ P.K., Wright D.W., Haselton F.R. A magnetic bead-based method for concentrating DNA from human urine for downstream detection // *PLOS ONE*. 2013. Vol. 8, no. 7. e68369. DOI: 10.1371/journal.pone.0068369
 101. Scherr T.F., Ryskoski H.B., Doyle A.B., Haselton F.R. A two-magnet strategy for improved mixing and capture from biofluids // *Biomicrofluidics*. 2016. Vol. 10. P. 024118-1–024118-15. DOI: 10.1063/1.4946014
 102. Dzheloda R.Kh., Petrov D.G., Shkinev V.M., Spivakov B.Yu. DNA recovery from environmental samples on suspension columns under a combined action of ultrasound and magnetic fields followed by polymerase chain reaction detection // *Mendelev Commun*. 2017. Vol. 27, is. 3. P. 302–303. DOI: 10.1016/j.mencom.2017.05.029
 103. Кулмамабетова Г. Пробоподготовка. Методы выделения ДНК/РНК. Астана: ЕНУ, 2012. URL: <https://studylib.ru/doc/2335021/probopodgotovka-metody-vydeleniya-dnk-rnk>.
 104. Chircov C., Grumezescu A.M., Holban A.M. Magnetic particles for advanced molecular diagnosis // *Materials*. 2019. Vol. 12. 2158. 17 p. DOI: 10.3390/ma12132158
 105. Walsh P.S., Metzger D.A., Higuchi R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material // *BioTechniques*. 1991. Vol. 10, no. 4. P. 506–513.
 106. Sepp R., Szabó I., Uda H., Sakamoto H. Rapid techniques for DNA extraction from routinely processed archival tis-

- sue for use in PCR // *J. Clin. Pathol.* 1994. Vol. 47, is. 4. P. 318-323. DOI: 10.1136/jcp.47.4.318
107. *Polski J.M., Kimzey S., Percival R.W., Grosso L.E.* Rapid and effective processing of blood specimens for diagnostic PCR using filter paper and Chelex-100 // *Mol. Pathol.* 1998. Vol. 51, is. 4. P. 215–217. DOI: 10.1136/mp.51.4.215
108. *Phillips K., McCallum N., Welch L.* A comparison of methods for forensic DNA extraction: Chelex® 100 and the QIAGEN DNA Investigator Kit (manual and automated) // *Forensic Sci. Int. Genet.* 2012. Vol. 6, no 2. P. 282–285. DOI: 10.1016/j.fsigen.2011.04.018
109. *Idris B., Goodwin W.* Comparison of Chelex®–100 with two solid phase DNA extraction techniques // *Forens. Sci. Int. Gen. Suppl. Ser.* 2015. Vol. 5. P. e274–e275. DOI: 10.1016/j.fsigs.2015.09.109
110. *Ip S.C., Lin S.W., Lai K.M.* An evaluation of the performance of five extraction methods: Chelex® 100, QIAamp® DNA Blood Mini Kit, QIAamp® DNA Investigator Kit, QIAAsymphony® DNA Investigator® Kit and DNA IQ™ // *Sci. Justice.* 2015. Vol. 55, no. 3. P. 200–208. DOI: 10.1016/j.scijus.2015.01.005
111. *Aygan A.* Nucleic Acid extraction from clinical specimens for PCR applications // *Turk. J. Biol.* 2006. Vol. 30, is. 2. P. 107–120.
112. *Fukui Y., Sawabe T.* Rapid detection of *Vibrio harveyi* in seawater by real-time PCR // *Microbes Environ.* 2008. Vol. 23, no. 2. P. 172–176. DOI: 10.1264/jsme2.23.173
113. *Musapa M., Kumwenda T., Mkulama M., et al.* A simple Chelex protocol for DNA extraction from *Anopheles* spp // *J. Vis. Exp.* 2013. Vol. 71. e3281. DOI: 10.3791/3281
114. *Al-Griw H.H., Zraba Z.A., Al-Muntaser S.K., et al.* Effects of storage temperature on the quantity and integrity of genomic DNA extracted from mice tissues: A comparison of recovery methods // *Open Veterinary J.* 2017. Vol. 7, no. 3. P. 239–243. DOI: 10.4314/ovj.v7i3.7
115. *Ruiz-Fuentes J.L., Diaz A., Entenza A.E., et al.* Comparison of four DNA extraction methods for the detection of *Mycobacterium leprae* from Ziehl-Neelsen-stained microscopic slides // *Int. J. Mycobacteriology.* 2015. Vol. 4, is. 4. P. 284–289. DOI: 10.1016/j.ijmyco.2015.06.005
116. *Kolia-Diafouka P., Godreuil S., Bourdin A., et al.* Optimized lysis-extraction method combined with IS6110-amplification for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in paucibacillary sputum specimens // *Front. Microbiol.* 2018. Vol. 9. 2224. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02224
117. *Leung E.T., Zheng L., Wong R.Y., et al.* Rapid and simultaneous detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and Beijing/W genotype in sputum by an optimized DNA extraction protocol and a novel multiplex real-time PCR // *J. Clin. Microbiol.* 2011. Vol. 49, no. 7. P. 2509–2515. DOI: 10.1128/JCM.00108-11
118. *Reyes-Escogido L., Balam-Chi M., Rodriguez-Buenfil I., et al.* Purification of bacterial genomic DNA in less than 20 min using chelex-100 microwave: examples from strains of lactic acid bacteria isolated from soil samples // *Antonie van Leeuwenhoek.* 2010. Vol. 98, no. 4. P. 465–474. DOI: 10.1007/s10482-010-9462-0
119. *Martin-Platero A.M., Peralta-Sánchez J.M., Soler J.J., Martínez-Bueno M.* Chelex-based DNA isolation procedure for the identification of microbial communities of eggshell surfaces // *Anal. Biochem.* 2010. Vol. 397, is. 2. P. 253–255. DOI: 10.1016/j.ab.2009.10.041
120. *Singh U.A., Kumari M., Iyengar S.* Method for improving the quality of genomic DNA obtained from minute quantities of tissue and blood samples using Chelex 100 resin // *Biological Procedures Online.* 2018. Vol. 20. 12. DOI: 10.1186/s12575-018-0077-6
121. *Lienhard A., Schäffer S.* Extracting the invisible: obtaining high quality DNA is a challenging task in small arthropods // *Peer J.* 2019. Vol. 7. e6753. DOI: 10.7717/peerj.6753
122. *Kapustin D.V., Prostyakova A.I., Alexeev Ya.I., et al.* High-throughput method of one-step DNA isolation for PCR diagnostics of *Mycobacterium tuberculosis* // *Acta Naturae.* 2014. Vol. 6, no. 2 (21). P. 48–52. URL: <http://actanaturae.ru/catalog/225.aspx>

**Институт аналитического приборостроения РАН,
Санкт-Петербург**

Контакты: Петров Дмитрий Григорьевич,
dimoop88@mail.ru

Материал поступил в редакцию 14.10.2019

METHODS FOR ISOLATION AND PURIFICATION OF DNA FROM CELL LYSATES (REVIEW)

D. G. Petrov, E. D. Makarova, N. N. Germash, I. E. Antifeev

Institute for Analytical Instrumentation of RAS, Saint-Petersburg, Russia

This review discusses methods for the isolation/purification of DNA from cell lysates, classified by the basic principles and specific means used for this purpose. Here are described advantages known to date, features of use and possible limitations for PCR analysis. The materials used include both review publications and some of "old" works that have still not lost their relevance and are the basis for the development of modern "home" methods for DNA isolation and purification. The reasons for this variety of DNA isolation and purification methods are quite objective: there is no and potentially cannot be created a unified procedure that would be equally effective in processing countless types of samples and PCR analysis objects and in conditions of dramatically different infrastructure and funding for laboratories using methods of molecular diagnostics. Therefore, in addition to increasing the D&R aimed at automation with the strategy "sample at the input — the result at the output", one cannot pass over the existing trend of developing corporate protocols aimed primarily at the maximum possible reduction in the cost of isolation procedures while maintaining DNA quality.

Keywords: nucleic acid, DNA isolation, DNA purification, silicon dioxide, spin column, magnetic particles, chelex, liquid phase methods

REFERENCES

- Hedman J., Knutsson R., Ansell R., et al. Pre-PCR processing in bioterrorism preparedness: improved diagnostic capabilities for laboratory response networks. *Bio-secur. Bioterro.*, 2013, vol. 11, suppl. 1, pp. S87–S101. DOI: 10.1089/bsp.2012.0090.
- Kralik P., Ricchi M.A. Basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: definitions, parameters, and everything. *Front. Microbiol.*, 2017, vol. 8, 108. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00108
- Bochkarev E.G., Denisova T.S., Generozov E.V., et al. *Genodiagnostika vo ftiziatrii* [Genodiagnosis in phthisiology]. Moscow, 2000. 15 p. (In Russ.). URL: <https://docplayer.ru/65216677-Genodiagnostika-vo-ftiziatrii.html>
- Doebler R.W., Erwin B., Hickerson A., et al. Continuous-flow, rapid lysis devices for biodefense nucleic acid diagnostic systems. *JALA*, 2009, June. pp. 119–125. DOI: 10.1016/j.jala.2009.02.010
- Martzy R., Kolm C., Krska R., et al. Challenges and perspectives in the application of isothermal DNA amplification methods for food and water analysis. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2019, vol. 411, pp. 1695–1702. DOI: 10.1007/s00216-018-1553-1
- Rantakokko-Jalava K., Jalava J. Optimal DNA isolation method for detection of bacteria in clinical specimens by broad-range PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 2002, vol. 40, no. 11, pp. 4211–4217. DOI: 10.1128/JCM.40.11.4211-4217.2002
- Thatcher S.A. DNA/RNA Preparation for molecular detection. *Clin. Chem.*, 2015, vol. 61, no. 1, pp. 89–99. DOI: 10.1373/clinchem.2014.221374
- Islam M.S., Aryasomayajula A., Selvaganapathy P.R. A review on macroscale and microscale cell lysis methods. *Micromachines*, 2017, vol. 8, is. 3, 83. DOI: 10.3390/mi8030083
- Rudi K., Jakobsen K.S. Overview of DNA purification for nucleic acid-based diagnostics from environmental and clinical samples. *Methods in Molecular Biology*, 2006, vol. 345, pp. 23–35. DOI: 10.1385/1-59745-143-6:23
- Burden D. Guide to the Disruption of Biological Samples. *Random Primers*, 2012, vol. 25, no. 12, pp. 1–25. URL: https://opsdiagnostics.com/applications/homogenization_guide_download.htm
- Gibbons L.E., Brangs H.C.G., Burden D.W. Bead Beating: A Primer (OPS Diagnostics, LLC). *Random Primers*, 2014, no. 12. URL: https://opsdiagnostics.com/notes/ranpri/OPSD_Bead_Beatig_Primer_2014%20v1.pdf
- Elphinstone J., Griffiths B., Goddard M., Stockdale E. Soil biology and soil health health partnership. Project 3: Molecular approaches for routine soil-borne disease and soil health assessment – establishing the scope. *Research Review*, no. 91140002-03, BBRO, 2018. 37 p. URL: <https://cereals.ahdb.org.uk/media/1362039/91140002-final-report-03pdf.pdf>
- Bakken L.R., Frostegård A. Nucleic acid extraction from soil. *Nucleic acids and proteins in soil*, eds. P. Nannipieri, K. Smalla, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2006, pp. 49–73.
- Lopuhov L.V., Ejdel'shtejn M.V. Polymerase chain reaction in clinical microbiological diagnosis. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya Terapiya* [Clinical Microbiology and Antimicrobial Therapy], 2000, vol. 2, no. 3, pp. 96–106. (In Russ.) URL: [50](https://cmac-

</div>
<div data-bbox=)

- journal.ru/publication/2000/3/cmac-2000-t02-n3-p096/cmac-2000-t02-n3-p096.pdf
15. Vaneechoutte M., Van Eldere J. The possibilities and limitations of nucleic acid amplification technology in diagnostic microbiology. *J. Med. Microbiol.*, 1997, vol. 46, pp. 188–194. DOI: 10.1099/00222615-46-3-188
 16. Hedman J., Rådström P. Overcoming inhibition in real-time diagnostic PCR. *Meth. Mol. Biol.*, 2013, vol. 943, pp. 17–48. DOI: 10.1007/978-1-60327-353-4_2
 17. Schrader C., Schielke A., Ellerbroek L., John R. PCR inhibitors — occurrence, properties and removal. *J. Appl. Microbiol.*, 2012, vol. 113, pp. 1014–1026. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x
 18. Wilson I.G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiology*, 1997, vol. 63, no. 10, pp. 3741–3751. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC168683/>
 19. Rådström P., Knutsson R., Wolffs P., et al. Pre-PCR processing: Strategies to generate PCR-compatible samples. *Mol. Biotechnol.*, 2004, vol. 26, pp. 133–146. DOI: 10.1385/MB:26:2:133
 20. Bessetti J. An introduction to PCR inhibitors. *Promega Corporation. Profiles in DNA*, 2007, vol. 10, is. 1, pp. 9–10. URL: <https://www.promega.es/-/media/files/resources/profiles-in-dna/1001/an-introduction-to-pcr-inhibitors.pdf?la=es-es>
 21. Matheson C.D., Gurney C., Esau N., Lehto R. Assessing PCR inhibition from humic substances. *The open enzyme inhibition J.*, 2010, vol. 3, pp. 38–45. DOI: 10.2174/1874940201003010038
 22. Demeke T., Jenkins G.R. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2010, vol. 396, pp. 1977–1990. DOI: 10.1007/s00216-009-3150-9
 23. Hu Q, Liu Y, Yi S, Huang D. The effect of six common PCR inhibitors on DNA polymerase and DNA template. *Int. J. Forensic Sci. Pathol.*, 2014, vol. 2, no. 8, pp. 1–4. DOI: 10.19070/2332-287X-1400017
 24. Sidstedt M., Jansson L., Nilsson E. et al. Humic substances cause fluorescence inhibition in real-time polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.*, 2015, vol. 487, pp. 30–37. DOI: 10.1016/j.ab.2015.07.002
 25. Sidstedt M., Hedman J., Romsos E.L. et al. Inhibition mechanisms of hemoglobin, immunoglobulin G, and whole blood in digital and real-time PCR. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2018, vol. 410, is. 10, pp. 2569–2583. DOI: 10.1007/s00216-018-0931-z
 26. Moore D.D., Chory J., Ribaldo R.K. Isolation and purification of large DNA restriction fragments from agarose gels. *Current Protocols in Immunology*, 1993, vol. 8, is. 1, pp. 10.5.1–10.5.12. DOI: 10.1002/0471142735.im1005s08
 27. Moore E., Arnscheidt A., Krüger A., et al. Simplified protocols for the preparation of genomic DNA from bacterial cultures. *Molecular Microbial Ecology Manual*, 2nd Ed., 2004, pp. 3–18.
 28. Tan S.C., Yiap B.C. DNA, RNA, and protein extraction: The past and the present. *J. Biomed. Biotechnol.*, 2009, vol. 2009, 574398. DOI: 10.1155/2009/574398
 29. Antonova O.S., Korneva N.A., Belov Yu.V., Kurochkin V.E. Methods of nucleic acids purification and separation in molecular biology (review). *Nauchnoe Priborostroenie [Scientific Instrumentation]*, 2010, vol. 20, no. 1, pp. 3–9. (In Russ.). URL: <http://iairas.ru/en/mag/2010/full/Art1.pdf>
 30. Palomo F.S., Celle Rivero M.G., Quiles M.G., et al. Comparison of DNA extraction protocols and molecular targets to diagnose tuberculous meningitis. *Tuberculosis Res. Treat.*, 2017, vol. 2017, 5089046. DOI: 10.1155/2017/5089046
 31. Purdy K.J. Nucleic acid recovery from complex environmental samples. *Method Enzymol.*, 2005, vol. 39, pp. 271–292. DOI: URL: 10.1016/S0076-6879(05)97016-X
 32. Ali N., de Cássia Pontello Rampazzo R., Costa A.D.T., Krieger M.A. Current nucleic acid extraction methods and their implications to point-of-care diagnostics. *BioMed Research Int.*, 2017, vol. 2017, 9306564. DOI: 10.1155/2017/9306564
 33. Chacon-Cortes D., Griffiths L. Methods for extracting genomic DNA from whole blood samples: current perspectives. *J. Biorepository Science for Applied Medicine*, 2014, vol. 2, pp. 1–9. DOI: 10.2147/BSAM.S46573
 34. Barbosa C., Nogueira S., Gadanho M., Chaves S. DNA extraction: finding the most suitable method. *Molecular Microbial Diagnostic Methods: Pathways to Implementation for the Food and Water Industries*, Chapter 7, Elsevier Inc., 2016, pp. 135–154.
 35. Zaveri P., Patel R., Patel M. Patel M., Sarodia D., Munshi N.S. Modification of extraction method for community DNA isolation from salt affected compact wasterland soil samples. *MethodsX*, 2017, vol. 4, pp. 63–67. DOI: 10.1016/j.mex.2017.01.002
 36. Lee S.B., Shewale J.G. DNA Extraction methods in forensic analysis. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons, 2017, pp. 1–18. DOI: 10.1002/9780470027318.a1104m
 37. Cheng H.-R., Jiang N. Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. *Biotechnol. Lett.*, 2006, vol. 28, no. 1, pp. 55–59. DOI: 10.1007/s10529-005-4688-z
 38. Zhang R., Gong H.-Q., Zeng X. et al. A Microfluidic liquid phase nucleic acid purification chip to selectively isolate DNA or RNA from low copy/single bacterial cells in minute sample volume followed by direct on-chip quantitative PCR assay. *Anal. Chem.*, 2013, vol. 85, no. 3, pp. 1484–1491. DOI: 10.1021/ac3026509
 39. Chomczynski P., Mackey K., Drews R., Wilfinger W. DNAzol: A reagent for the rapid isolation of Genomic DNA. *BioTechniques*, 1997, vol. 22, no. 3, pp. 550–553. DOI: 10.2144/97223pf01
 40. Rodriguez-Garcia A., Mares R.E., Muñoz P.L.A., et al. DNA extraction with DNAzol and LAMP, performed in a heating block as a simple procedure for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum specimens. *Methods and Protoc.*, 2018, vol. 1, is. 4, 37. DOI: 10.3390/mps1040037
 41. Ligozzi M., Fontana R. Isolation of total DNA from bacteria and yeast. *Afr. J. Biotechnol.*, 2003, vol. 2, no. 8, pp. 251–253. DOI: 10.5897/AJB2003.000-1052

42. Kissoudi M., Samanidou V. Recent Advances in applications of ionic liquids in miniaturized microextraction techniques. *Molecules*, 2018, vol. 23, is. 6, 1437. DOI: 10.3390/molecules23061437
43. Fuchs-Telka S., Fister S., Mester P.-J., et al. Hydrophobic ionic liquids for quantitative bacterial cell lysis with subsequent DNA quantification. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2017, vol. 409, no. 6, pp. 1503–1511. DOI: 10.1007/s00216-016-0112-x
44. Vedernikov V.E. Comparative characteristics of nucleic acid extraction methods. *Laboratoriya* [Laboratory], 2012, no. 4, pp. 14–15. (In Russ.).
45. Aukenov N.E., Masabaeva M.R., Hasanova U.U. Isolation and purification of nucleic acids. State of the problem at the present stage. *Nauka i zdravoohranenie* [Science and healthcare], 2014, no. 1, pp. 51–53. (In Russ.).
46. Madhad V.J., Senthil K.P. The rapid & non-enzymatic isolation of DNA from the human peripheral whole blood suitable for genotyping. *Eur. J. Biotechnol. Biosci.*, 2014, vol. 1, is. 3, pp. 1–16. URL: <http://www.biosciencejournals.com/vol1/issue3/26.html>
47. Sakyi S.A., Kumi B., Ephraim R.D. et al. Modified DNA extraction technique for use in resource-limiting setting: Comparison of salting out methods versus QIAamp blood mini kit. *Ann. Med. Health Sci. Res.*, 2017, vol. 7, is. 3, pp. 131–136. URL: <https://www.amhsr.org/articles/modified-dna-extraction-technique-for-use-in-resourcelimited-settings-comparison-of-salting-out-methods-versus-qiaamp-bl.pdf>
48. Al-Shuhaib M.B.S. A minimum requirements method to isolate large quantities of highly purified DNA from one drop of poultry blood. *J. Genetics*, 2018, vol. 97, pp. 87–94. DOI: 10.1007/s12041-018-0983-z
49. Wells D.A., Herron L.L. Automation of sample preparation for genomics. *LC·GC Europe*, 2002, vol. 15, no. 11, pp. 712–720.
50. Boom R., Sol C.J., Salimans M.M. et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.*, 1990, vol. 28, no. 3, pp. 495–503. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC269651/pdf/jcm00051-0103.pdf>
51. Zähringer H. Don't lose the thread. Product survey: Manual DNA extraction kits. *Lab Times*, 2012, no. 6, pp. 52–56. URL: <https://docplayer.net/53735876-Pure-dna-devoid-of-impurities-from.html>
52. Li J.-F., Li L., Sheen J. Protocol: a rapid and economical procedure for purification of plasmid or plant LNA with diverse applications in plant biology. *Plant Methods*, 2010, vol. 6, 1. DOI: 10.1186/1746-4811-6-1
53. Huanca-Mamani W., Rivera-Cabello D., Maita-Maita J. A simple, fast and inexpensive CTAB-PVP-silica based method for genomic DNA isolation from single, small insect larvae and pupae. *Genetics and Molecular Res.*, 2015, vol. 14, no. 3, pp. 8001–8007. DOI: 10.4238/2015.July.17.8
54. Rohland N., Hofreiter M. Comparison and optimization of ancient DNA extraction. *BioTechniques*, 2007, vol. 42, pp. 343–352. DOI: 10.2144/000112383
55. Devi S.G., Fathima A.A., Radha S. et al. A rapid and economical method for efficient DNA extraction from diverse soils suitable for metagenomic applications. *PLoS ONE*, 2015, vol. 10, no. 7, e0132441. DOI: 10.1371/journal.pone.0132441
56. Wang X., Xing L., Shu Y., et al. Novel polymeric ionic liquid microspheres with high exchange capacity for fast extraction of plasmid DNA. *Anal. Chim. Acta*, 2014, vol. 837, pp. 64–69. DOI: 10.1016/j.aca.2014.06.002
57. Shakhmaeva I.I., Bulatov E.R., Bondar O.V., et al. Binding and purification of plasmid DNA using multilayered carbon nanotubes. *J. Biotechnol.*, 2011, vol. 152, no. 3, pp. 102–107. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2011.01.022
58. Topçu A.A., Aşır S., Türkmen D. DNA purification by solid phase extraction (SPE) methods. *Hacettepe J. Biol. & Chem.*, 2016, vol. 44, is. 3, pp. 259–266. URL: <http://www.hjbc.hacettepe.edu.tr/site/assets/files/4121/08-259-266.pdf>
59. Nacham O., Clark K.D., Anderson J.L. Extraction and purification of DNA from complex biological sample matrices using solid-phase microextraction coupled with real-time PCR. *Anal. Chem.*, 2016, vol. 88, pp. 7813–7820. URL: <https://pdfs.semanticscholar.org/093b/da2eddf068f83212b7517dcabe796d8c25f9.pdf>
60. Holmberg R.C., Gindlesperger A., Stokes T., et al. Akonni TruTip® and Qiagen® methods for extraction of fetal circulating DNA — evaluation by real-time and digital PCR. *PLoS One*, 2013, vol. 8, no. 8, e73068. DOI: 10.1371/journal.pone.0073068
61. Frickmann H., Hinz R., Hagen R.M. Comparison of an automated nucleic acid extraction system with the column-based procedure. *Eur. J. Microbiol. Immunol.*, 2015, vol. 5, no. 1, pp. 94–102. DOI: 10.1556/EUJMI-D-14-00040
62. Mandal G., Das S., Padmanabhan S. Development of a membrane-based method for isolation of genomic DNA from human blood. *J. Biomol. Techniques*, 2018, vol. 29, is. 3, pp. 46–53. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5865945/>
63. Beall S.G., Cantera J., Diaz M.H., et al. Performance and workflow assessment of six nucleic acid extraction technologies for use in resource limited settings. *PLoS ONE*, 2019, vol. 14, no. 4, e0215753. URL: 10.1371/journal.pone.0215753
64. Thakore N., Garber S., Bueno A. et al. A bench-top automated workstation for nucleic acid isolation from clinical sample types. *J. Microbiol. Methods*, 2018, vol. 148, pp. 174–180. P. 174–180. DOI: 10.1016/j.mimet.2018.03.021
65. Holmberg R.C., Gindlesperger A., Stokes T., et al. High-throughput, automated extraction of DNA and RNA from clinical samples using TruTip technology on common liquid handling robots. *J. Vis. Exp.*, 2013, vol. 76, e50356. DOI: 10.3791/50356
66. Bag S., Saha B., Mehta O., et al. An improved method for high quality metagenomics DNA extraction from human and environmental samples. *Sci. Rep.*, 2016, vol. 6, 26775. DOI: 10.1038/srep26775
67. Zhou Y., Zhang Y., He W., et al. Rapid regeneration and reuse of silica columns from PCR purification and gel extraction kits. *Sci. Rep.*, 2018, vol. 8, 12870.

68. Shi R., Lewis R.S., Panthee D.R. Filter paper-based spin column method for cost-efficient DNA or RNA purification. *PLoS ONE*, 2018, vol. 13, no 12, e0203011. DOI: 10.1371/journal.pone.0203011
69. Shipley M.A., Koehler J.W., Kulesh D.A., Minogue T.D. Comparison of nucleic acid extraction platforms for detection of select biothreat agents for use in clinical resource limited settings. *J. Microbiol. Methods*, 2012, vol. 91, no. 1, pp. 179–183. DOI: 10.1016/j.mimet.2012.06.008
70. UNITAID. *Tuberculosis. Diagnostics technology landscape*. 5th edition, Geneva, 2017. 90 p. URL: <http://unitaid.org/assets/2017-Unitaid-TB-Diagnostics-Technology-Landscape.pdf>
71. Thakore N., Norville R., Franke M., et al. Automated TruTip nucleic acid extraction and purification from raw sputum. *PLoS ONE*, 2018, vol. 13, no. 7, e0199869. DOI: 10.1371/journal.pone.0199869
72. Akonni Biosystems. Inc. TruTip[®] Automated Workstation. URL: <https://akonni.com/technology/sample-prep/>
73. Poh J.-J., Gan K.-E. The determination of factors involved in column-based nucleic acid extraction and purification. *J. Bioprocess. Biotechniq.*, 2014, vol. 4, no. 3, 1000157. DOI: 10.4172/2155-9821.1000157
74. Katevatis C., Fan A., Klapperich C.M. Low concentration DNA extraction and recovery using a silica solid phase. *PLOS One*, 2017, vol. 12, no. 5, e0176848. DOI: 10.1371/journal.pone.0176848
75. Petrov D.G., Makarova E.D., Korneva N.A., Aldekeeva A.S., Knyazkov N.N. The effect of fields of different nature on the yield of DNA upon separation from model solutions on silicon dioxide. 1. Effect of temperature. *Nauchnoe Priborostroenie* [Scientific Instrumentation], 2015, vol. 25, no. 2, pp. 91–101. (In Russ.). DOI: 10.18358/np-25-2-i91101
76. Petrov D. G., Makarova E. D., Antifeev I. E., Brodskaya A. V., Konstantinova N. N., Malyshev S. N. The effect of fields of different nature on the yield of DNA upon separation from model solutions on silicon dioxide. The effect of ultrasound. *Nauchnoe Priborostroenie* [Scientific Instrumentation], 2017, vol. 27, no. 4, pp. 40–55. (In Russ.). DOI: 10.18358/np-27-4-i4055
77. Kathiravan M.N., Gim G.H., Ryu J., et al. Enhanced method for microbial community DNA extraction and purification from agricultural yellow loess soil. *J. Microbiol.*, 2015, vol. 53, no. 11, pp. 767–775. DOI: 10.1007/s12275-015-5454-0
78. Tan S.C., Ong C.E., Hay Y.K., Yiap B.C. Cellulose and its application in biomolecules purification. *Intl. Res. J. Appl. Basic Sci.*, 2013, vol. 7, no. 5, pp. 267–276.
79. Zou Y., Mason M.G., Wang Y., et al. Nucleic acid purification from plants, animals and microbes in under 30 seconds. *PLoS Biology*, 2017, vol. 15, no. 11, e2003916. DOI: 10.1371/journal.pbio.2003916
80. Bangs Laboratories, Inc. *Magnetic microspheres*. *Tech-Note 102*. URL: <https://www.bangslabs.com/sites/default/files/imce/docs/TechNote%20102%20Web.pdf>
81. Rudi K., Kroken M., Dahlberg O.J., et al. Rapid, universal method to isolate PCR-ready DNA using magnetic beads. *Bio Techniques*, 1997, vol. 22, no. 3, pp. 506–511. DOI: 10.2144/97223rr01
82. Deggerdal A., Larsen F. Rapid isolation of PCR-ready DNA from blood, bone marrow and cultured cells, based on paramagnetic beads. *BioTechniques*, 1997, vol. 22, no. 3, pp. 554–557. DOI: 10.2144/97223pf02
83. Stemmer C., Beau-Faller M., Pencreach E., et al. Use of magnetic beads for plasma cell-free DNA extraction: Toward automation of plasma DNA analysis for molecular diagnostics. *Clin. Chem.*, 2003, vol. 49, no 11, pp. 1953–1955.
84. Romeika J.M., Yan F. Recent Advances in Forensic DNA Analysis. *J. Forensic Res.*, 2013, S12, 001, 13 p. DOI: 10.4172/2157-7145.S12-001
85. Gong R., Li S. Extraction of human genomic DNA from whole blood using a magnetic microsphere method. *Int. J. Nanomed*, 2014, vol. 9, pp. 3781–3789. DOI: 10.2147/IJN.S59545
86. Haddad Y., Xhaxhiu K., Kopel P., et al. The isolation of DNA by polycharged magnetic particles: an analysis of the interaction by Zeta potential and particle size. *Int. J. Mol. Sci.*, 2016, vol. 17, is. 4, pp. 550–561. DOI: 10.3390/ijms17040550
87. Saiyed Z.M., Ramchand C.N., Telang S.D. Isolation of genomic DNA using magnetic nanoparticles as a solid-phase support. *J. Phys. Condens. Matter*, 2008, vol. 20, no. 20, 204153. DOI: 10.1088/0953-8984/20/20/204153
88. Niemirowicz K., Wilczewska A.Z., Car G. Magnetic nanoparticles as separators of nucleic acids. *Chemik*, 2013, vol. 67, no. 10, pp. 836–841.
89. Yi L., Huang Y., Wu T., Wu J. A magnetic nanoparticles-based method for DNA extraction from the saliva of stroke patients. *Neural Regeneration Research*, 2013, vol. 8, no. 32, pp. 3036–3046. DOI: 10.3969/j.issn.1673-5374.2013.32.007
90. Sirdah M.M. Superparamagnetic–bead based method: An effective DNA extraction from dried blood spots (DBS) for diagnostic PCR. *J. Clin. Diagn. Res.*, 2014, vol. 8, no. 4, pp. FC01–FC04. DOI: 10.7860/JCDR/2014/8171.4226
91. Sawant D.V., Bohara R.A., Patil R.S., Pawar S.H. Detection of Mycobacterium tuberculosis from pulmonary sputum sample using SPION mediated DNA extraction method. *Res. J. Life Sci., Bioinformatics, Pharm. Chem. Sci. (RJLBPCS)*, 2018, vol. 4, no. 1, pp. 91–105. DOI: 10.26479/2018.0401.08
92. Chiang C.L., Sung C.S., Wu T.F., et al. Application of superparamagnetic nanoparticles in purification of plasmid DNA from bacterial cells. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2005, vol. 822, no. 1-2, pp. 54–60. DOI: 10.1016/j.jchromb.2005.05.017
93. Danthanarayana A.N., Manatunga D.C., de Silva R.M. et al. Magnetofection and isolation of DNA using polyethyleneimine functionalized magnetic iron oxide nanoparticles. *R. Soc. Open. Sci.*, 2018, vol. 5, is. 12, 181369. DOI: 10.1098/rsos.181369
94. Volkova N.N., Derjabin O.N., Yanishpolskii V.V., Dudchenko N.O. Isolation of ultrapure plasmid DNA from bacterial cells with silica-magnetite nanoparticles. *Annales, Universitatis Mariae Curie-Skłodowska, Lublin – Polonia, Sectio AA*, 2007, vol. LXII, no. 22, pp. 250–260.

- URL:
http://dlibra.umcs.lublin.pl/Content/24167/czas4051_62_2007_22.pdf
95. Quy D.V., Hieu N.M., Tra P.T., et al. Synthesis of silica-coated magnetic nanoparticles and application in the detection of pathogenic viruses. *J. Nanomaterials*, 2013, vol. 2013, 603940. (6 p.) DOI: 10.1155/2013/603940
 96. Liu Q., Li J., Liu H., et al. Rapid, cost-effective DNA quantification via a visually-detectable aggregation of superparamagnetic silica-magnetite nanoparticles. *Nano Research*, 2014, vol. 7, no. 5, pp. 755–784. DOI: 10.1007/s12274-014-0436-9
 97. Oberacker P., Stepper P., Bond D.M., et al. Bio-on-magnetic-beads (BOMB): Open platform for high-throughput nucleic acid extraction and manipulation. *PLoS Biol.*, 2019, vol. 17, no. 1, e3000107. DOI: 10.1371/journal.pbio.3000107
 98. Sur K., McFall S.M., Yeh E.T., et al. Immiscible phase nucleic acid purification eliminates PCR inhibitors with a single pass of paramagnetic particles through a hydrophobic liquid. *J. Mol. Diagnostics*, 2010, vol. 12, no. 5, pp. 620–628. DOI: 10.2353/jmoldx.2010.090190
 99. Berry S.M., Alarid E.T., Beebe D.J. One-step purification of nucleic acid for gene expression analysis via immiscible filtration assisted by surface tension (IFAST). *Lab. Chip*, 2011, vol. 11, no. 10, pp. 1747–1753. DOI: 10.1039/c1lc00004g
 100. Bordelon H., Russ P.K., Wright D.W., Haselton F.R. A magnetic bead-based method for concentrating DNA from human urine for downstream detection. *PLOS ONE*, 2013, vol. 8, no. 7, e68369. DOI: 10.1371/journal.pone.0068369
 101. Scherr T.F., Ryskoski H.B., Doyle A.B., Haselton F.R. A two-magnet strategy for improved mixing and capture from biofluids. *Biomicrofluidics*, 2016, vol. 10, pp. 024118-1–024118-15. DOI: 10.1063/1.4946014
 102. Dzenloda R.Kh, Petrov D.G., Shkinev V.M., Spivakov B.Yu. DNA recovery from environmental samples on suspension columns under a combined action of ultrasound and magnetic fields followed by polymerase chain reaction detection. *Mendeleev Commun.*, 2017, vol. 27, is. 3, pp. 302–303. DOI: 10.1016/j.mencom.2017.05.029
 103. Kulmamabetova G. *Probopodgotovka. Metody vydeleniya DNK/RNK* [Sample preparation. DNA / RNA isolation methods.]. Astana, ENU, 2012. (In Russ.). URL: <https://studylib.ru/doc/2335021/probopodgotovka-metody-vydeleniya-dnk-rnk>.
 104. Chircov C., Grumezescu A.M., Holban A.M. Magnetic particles for advanced molecular diagnosis. *Materials*, 2019, vol. 12, is. 13, 2158. (17 p.) DOI: 10.3390/ma12132158
 105. Walsh P.S., Metzger D.A., Higuchi R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques*, 1991, vol. 10, no. 4, pp. 506–513.
 106. Sepp R., Szabó I., Uda H., Sakamoto H. Rapid techniques for DNA extraction from routinely processed archival tissue for use in PCR. *J. Clin. Pathol.*, 1994, vol. 47, is. 4, pp. 318–323. DOI: 10.1136/jcp.47.4.318
 107. Polski J.M., Kimzey S., Percival R.W., Grosso L.E. Rapid and effective processing of blood specimens for diagnostic PCR using filter paper and Chelex-100. *Mol. Pathol.*, 1998, vol. 51, is. 4, pp. 215–217. DOI: 10.1136/mp.51.4.215
 108. Phillips K., McCallum N., Welch L. A comparison of methods for forensic DNA extraction: Chelex[®] 100 and the QIAGEN DNA Investigator Kit (manual and automated). *Forensic Sci. Int. Genet.*, 2012, vol. 6, no 2, pp. 282–285. DOI: 10.1016/j.fsigen.2011.04.018
 109. Idris B., Goodwin W. Comparison of Chelex[®]-100 with two solid phase DNA extraction techniques. *Forens. Sci. Int. Gen. Suppl. Ser.*, 2015, vol. 5, pp. e274–e275. DOI: 10.1016/j.fsigs.2015.09.109
 110. Ip S.C., Lin S.W., Lai K.M. An evaluation of the performance of five extraction methods: Chelex[®] 100, QIAamp[®] DNA Blood Mini Kit, QIAamp[®] DNA Investigator Kit, QIASymphony[®] DNA Investigator[®] Kit and DNA IQ[™]. *Sci. Justice*, 2015, vol. 55, no. 3, pp. 200–208. DOI: 10.1016/j.scijus.2015.01.005
 111. Aygan A. Nucleic Acid extraction from clinical specimens for PCR applications. *Turk. J. Biol.*, 2006, vol. 30, is. 2, pp. 107–120.
 112. Fukui Y., Sawabe T. Rapid detection of vibrio harveyi in seawater by real-time PCR. *Microbes Environ.*, 2008, vol. 23, no. 2, pp. 172–176. DOI: 10.1264/jsme.23.173
 113. Musapa M., Kumwenda T., Mkulama M., et al. A simple Chelex protocol for DNA extraction from *Anopheles* spp. *J. Vis. Exp.*, 2013, vol. 71, e3281. DOI: 10.3791/3281
 114. Al-Griw H.H., Zraba Z.A., Al-Muntaser S.K., et al. Effects of storage temperature on the quantity and integrity of genomic DNA extracted from mice tissues: A comparison of recovery methods. *Open Veterinary J.*, 2017, vol. 7, no. 3, pp. 239–243. DOI: 10.4314/ovj.v7i3.7
 115. Ruiz-Fuentes J.L., Diaz A., Entenza A.E., et al. Comparison of four DNA extraction methods for the detection of *Mycobacterium leprae* from Ziehl-Neelsen-stained microscopic slides. *Int. J. Mycobacteriology*, 2015, vol. 4, is. 4, pp. 284–289. DOI: 10.1016/j.ijmyco.2015.06.005
 116. Kolia-Diafouka P., Godreuil S., Bourdin A., et al. Optimized lysis-extraction method combined with IS6110-amplification for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in paucibacillary sputum specimens. *Front. Microbiol.*, 2018, vol. 9, 2224. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02224
 117. Leung E.T., Zheng L., Wong R.Y., et al. Rapid and simultaneous detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and Beijing/W genotype in sputum by an optimized DNA extraction protocol and a novel multiplex real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 2011, vol. 49, no. 7, pp. 2509–2515. DOI: 10.1128/JCM.00108-11
 118. Reyes-Escogido L., Balam-Chi M., Rodriguez-Buenfil I., et al. Purification of bacterial genomic DNA in less than 20 min using chelex-100 microwave: examples from strains of lactic acid bacteria isolated from soil samples. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2010, vol. 98, no. 4, pp. 465–474. DOI: 10.1007/s10482-010-9462-0
 119. Martin-Platero A.M., Peralta-Sánchez J.M., Soler J.J., Martinez-Bueno M. Chelex-based DNA isolation procedure for the identification of microbial communities of eggshell surfaces. *Anal. Biochem.*, 2010, vol. 397, is. 2, pp. 253–255. DOI: 10.1016/j.ab.2009.10.041

120. Singh U.A., Kumari M., Iyengar S. Method for improving the quality of genomic DNA obtained from minute quantities of tissue and blood samples using Chelex 100 resin. *Biological Procedures Online*, 2018, vol. 20, 12. DOI: 10.1186/s12575-018-0077-6
121. Lienhard A., Schäffer S. Extracting the invisible: obtaining high quality DNA is a challenging task in small arthropods. *Peer J.*, 2019, vol. 7, e6753. DOI: 10.7717/peerj.6753
122. Kapustin D.V., Prostyakova A.I., Alexeev Ya.I., et al. High-throughput method of one-step DNA isolation for PCR diagnostics of *Mycobacterium tuberculosis*. *Acta Naturae*, 2014, vol. 6, no. 2 (21), pp. 48–52. URL: <http://actanaturae.ru/catalog/225.aspx>

Contacts: *Petrov Dmitriy Grigorievitch*,
dimoon88@mail.ru

Article received by the editorial office on 14.10.2019