



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C12N 15/1003 (2021.05); C12Q 1/68 (2021.05); G01N 33/50 (2021.05)

(21)(22) Заявка: 2020140964, 11.12.2020

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
11.12.2020Дата регистрации:
23.08.2021

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 11.12.2020

(45) Опубликовано: 23.08.2021 Бюл. № 24

Адрес для переписки:

197758, Санкт-Петербург, п. Песочный, ул.
Ленинградская, 70, ФГБУ "РНЦРХТ
им. академика А.М. Гранова"
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РФ, Попова Алена Александровна

(72) Автор(ы):

Евтушенко Владимир Иванович (RU),
Майстренко Дмитрий Николаевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«РОССИЙСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
РАДИОЛОГИИ И ХИРУРГИЧЕСКИХ
ТЕХНОЛОГИЙ ИМЕНИ АКАДЕМИКА
А.М. ГРАНОВА» МИНИСТЕРСТВА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ (RU)(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2539030 C1, 11.11.2013. RU
2650865 C1, 29.11.2016. АМИРХАНОВ Р.Н. и
др., КОМПОЗИТЫ ПЕПТИДО-
НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ С
НАНОЧАСТИЦАМИ ДИОКСИДА
ТИТАНА II+. ДИССОЦИАЦИЯ ДНК/ПНК
ДУПЛЕКСОВ В СОСТАВЕ
НАНОКОМПОЗИТОВ TiO₂-ПОЛИЛИЗИН-
ДНК/ПНК И В РАСТВОРЕ. ВЛИЯНИЕ
ПОЛИЛИЗИНА, БИООРГАНИЧЕСКАЯ
ХИМИЯ, 2013, т. 39, н. 6, стр. 705. RU 2372405
C1, 04.08.2008. (см. прод.)

(54) Набор для выделения ДНК

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине и
представляет собой набор для выделения
внуклеточной ДНК, состоящий из связывающего
буфера на основе 5,5 М гуанидинтиоцианата, 5
мМ Трилона Б, 10 мМ Трис-НСl рН 8,0,
отмывочного буфера на основе 80% этанола и
элюирующего буфера на основе 10 мМ Трис-НСl
и 1 мМ Трилона Б с рН 8,5, ДНК-аффинногополипептида (термический полилизин с
молекулярной массой 10-30 килодальтон) и
суспензии сорбента - частиц магнетита, покрытых
слоем силикагеля, общим диаметром 1,5 микрона.
Изобретение позволяет повысить выход
внуклеточной ДНК из биологических жидкостей,
чистоту выделяемой ДНК и сократить время ее
выделения. 1 табл., 2 ил., 1 пр.

(56) (продолжение):

QING-BIN YUAN et al., Redistribution of intracellular and extracellular free & adsorbed antibiotic resistance genes through a wastewater treatment plant by an enhanced extracellular DNA extraction method with magnetic beads,

Environment International, 2019, Vol. 131, 104986. РЫКОВА Е.Ю и др., Циркулирующие внеклеточные ДНК и РНК крови в диагностике опухолей молочной железы, Биомедицинская химия, 2008, т. 54, н. 1, стр. 94-103.
ZINGER L. et al., Extracellular DNA extraction is a fast, cheap and reliable alternative for multi-taxa surveys based on soil DNA, Soil Biology and Biochemistry, 2016, Vol. 96, pp. 16-19.

R U 2 7 5 3 7 6 8 C 1

R U 2 7 5 3 7 6 8 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C12N 15/10 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

C12N 15/1003 (2021.05); *C12Q 1/68* (2021.05); *G01N 33/50* (2021.05)(21)(22) Application: **2020140964**, 11.12.2020(24) Effective date for property rights:
11.12.2020Registration date:
23.08.2021

Priority:

(22) Date of filing: 11.12.2020

(45) Date of publication: 23.08.2021 Bull. № 24

Mail address:

197758, Sankt-Peterburg, p. Pesochnyj, ul.
Leningradskaya, 70, FGBU "RNTSRKHT
im.akademika A.M.Granova" MINISTERSTVA
ZDRAVOOKHRANENIYA RF, Popova Alena
Aleksandrovna

(72) Inventor(s):

**Evtushenko Vladimir Ivanovich (RU),
Maistrenko Dmitrii Nikolaevich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**FEDERALNOE GOSUDARSTVENNOE
BIuDZhETNOE UChREZhDENIE
«ROSSIISKII NAUChNYI TsENTR
RADIOLOGII I KhIRURGICHESKIKh
TEKhNOLOGII IMENI AKADEMIKA A.M.
GRANOVA» MINISTERSTVA
ZDRAVOOKhRANENIIa ROSSIISKOI
FEDERATsII (RU)**

(54) **DNA EXTRACTION KIT**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to medicine and is a set for extracellular DNA extraction consisting of a binding buffer based on 5.5 M guanidine thiocyanate, 5 mM Trilon B, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, a washing buffer based on 80% ethanol and an eluting buffer based on 10 mM Tris-HCl and 1 mM Trilon B with pH 8.5, a DNA-affine polypeptide (thermal polylysine with a

molecular weight of 10-30 kilodaltons) and suspensions of sorbent: magnetite particles coated with a layer of silica gel, with a total diameter of 1.5 microns.

EFFECT: invention makes it possible to increase the yield of extracellular DNA from biological fluids, provides the purity of the released DNA and reduces the time of its isolation.

1 cl, 2 dwg, 1 tbl, 1 ex

Изобретение относится к медицине, а именно к биохимическим исследованиям биологических объектов, и может найти применение в диагностике злокачественных, вирусных и наследственных заболеваний.

В последние годы интенсивно разрабатывается новый подход персонализированной оценки рисков заболеваний - так называемая "жидкая биопсия" - малоинвазивная, ранняя диагностика опухолей, неонкологических патологий, а также пренатальная диагностика на основе генетического анализа внеклеточной, так называемой "свободно циркулирующей внеклеточной ДНК" (вкДНК). Главное достоинство разрабатываемой платформы "жидкой биопсии" - малая инвазивность взятия биологического образца. Ключевым моментом и сложностью этого подхода является необходимость эффективного выделения сверхмалых количеств внеклеточной ДНК, измеряемых нанограммами на миллилитр из биологических жидкостей содержащих большое количество белка, в миллионы раз превышающего количество вкДНК. Наборы, широко используемые для выделения геномной ДНК из тканей и клеток для этих целей, не подходят, так как в процессе выделения вкДНК теряется.

Существующие коммерческие наборы (QIAGEN, Zymo, Applied Biosystems, Invitrogen, Macherey-Nagel) для выделения вкДНК основаны на предварительном ферментативном удалении избытка белка протеиназой К в буфере, содержащем детергент додецилсульфат натрия, с последующим связыванием депротеинизированной вкДНК с силикагелем (или магнитными частицами, покрытыми слоем силикагеля) в присутствии высоких концентраций гуанидинтиоцианата (ГТЦ), для чего к исходному объему сыворотки добавляют 2-3 объема раствора ГТЦ, что существенно увеличивает исходный объем биожидкости и снижает эффективность выделения вкДНК, а кроме того, крайне неудобно для последующих манипуляций с большими объемами жидкости, требующими перехода от стандартных пробирок и центрифуг для процессирования проб объемом 1,5 мл к более дорогим центрифугам, работающим в диапазоне 15-50 мл. Использование протеиназы К и добавлений 2-3-кратных объемов связывающего раствора лежит в основе всех существующих в настоящее время коммерческих наборов для выделения внеклеточной ДНК из биологических жидкостей QIAamp Circulating Nucleic Acid kit (Qiagen), MagMAX Cell-Free DNA Isolation Kit (Applied Biosystems), Quick-cfDNA Serum & Plasma Kit (ZYMO Research), PME Free-Circulating DNA Extraction Kit and PME Free-Circulating DNA (Analyti Jena, AG), Apostle MiniMax™ High Efficiency Cell-Free DNA Isolation Kit (Beckman Coulter).

Наиболее часто используемым и близким к предлагаемому является набор QIAamp Circulating Nucleic Acid kit компании Qiagen (QIAamp Circulating Nucleic Acid Handbook, October 2019. QIAGEN), который взят нами в качестве прототипа.

В состав прототипа входят следующие компоненты: раствор протеиназы К, лиофилизированная РНК для блока неспецифической сорбции мембраны колонок, 5 буферных растворов (лизисный, связывающий (5,5 М гуанидинтиоцианата, 5 мМ Трилона Б, 10 мМ Трис-НСl рН 8,0), первый отмывочный (гуанидинхлорид), второй отмывочный (80% этанола) и элюирующий (10 мМ Трис-НСl и 1 мМ Трилона Б с рН 8,5), колонки с ДНК-связывающей мембраной, а также насадки на колонки, позволяющие фильтровать объемы жидкости 2-10 мл, соединители колонок и приемника, собственно приемник элюата и вакуумный насос для просасывания разбавленного элюата через мембрану колонки. Набор позволяет выделять внеклеточную ДНК из плазмы крови или мочи с высоким выходом.

Согласно протоколу набора-прототипа, в каждую пробу плазмы крови добавляется синтетическая РНК в количестве 1120 нг для блокировки неспецифической сорбции

ДНК мембраной колонки. Внесенная в пробу РНК выделяется вместе с искомой внеклеточной ДНК. Любая примесь в очищенном препарате ДНК крайне нежелательна, так как может ингибировать активность термополимеразы, снижая, таким образом, эффективность ПЦР анализа.

5 Использование в наборе-прототипе ферментативной деградации белка с помощью протеиназы К и специального лизирующего буфера для удаления избытка белка плазмы приводит к дополнительному разбавлению пробы и удлинению процедуры выделения ДНК.

10 Также существенным ограничением набора прототипа является то, что процессируемый максимальный объем пробы по протоколу компании Qiagen, не превышает 5 мл для плазмы и для 4 мл мочи. Это особенно ограничивает выделение необходимого для последующего анализа количества вкДНК из мочи, где часто требуется выделять из объема 30-40 мл.

15 Набор-прототип требует использования фильтрующих колонок, насадок к колонкам для увеличения объема фильтруемой жидкости, фильтрующего приемника элюата, вакуумного насоса, термостата и центрифуги, то есть является ресурсоемким и трудоемким. По этой причине количество проб, одновременно процессируемых с помощью прототипа ограничен количеством приемников колонок фильтрующего устройства и составляет 24 образца, что недостаточно при рутинном анализе большого количества образцов.

20 В связи с вышеизложенным, процедура выделения ДНК набором прототипом достаточно трудоемкая и длительная, она занимает по данным разработчика прототипа 2-3 часа, а также выделенная ДНК в существенной мере имеет примеси синтетической РНК и примесь белка.

25 Технический результат настоящего изобретения состоит в повышении выхода внеклеточной ДНК из биологических жидкостей, чистоты выделяемой ДНК, а также сокращении времени ее выделения.

30 Этот результат достигается тем, что в известном наборе для выделения ДНК, состоящем из связывающего буфера на основе 5,5 М гуанидинтиоцианата, 5 мМ Трилона Б, 10 мМ Трис-НСI pH 8,0, отмывочного буфера на основе 80% этанола и элюирующего буфера на основе 10 мМ Трис-НСI и 1 мМ Трилона Б с pH 8,5, согласно изобретению, дополнительно набор содержит ДНК-аффинный полипептид (термический полилизин с молекулярной массой 10-30 килодальтон) и суспензию сорбента - частиц магнетита, покрытых слоем силикагеля, общим диаметром 1,5 микрона.

35 На сегодняшний день в протоколах известных наборов для выделения ДНК используется стадия ферментативного разрушения белка (гидролиз протеиназой К) с последующим разбавлением исходной пробы лизисным и связывающим растворами. Это приводит к разбавлению пробы и снижению выхода внеклеточной ДНК, а также к усложнению и удлинению процедуры выделения.

40 В связи с этим мы попробовали применить метод выделения ДНК, основанный на аффинном связывании ДНК с термическим полипептидом с полилизином и осаждения комплекса ДНК-полилизин центрифугированием.

45 Использование в наборе раствора ДНК-аффинного пептида (термического полилизина с молекулярной массой 10-30 килодальтон), который составляет 1/10 часть от исходного объема пробы, обеспечивает связывание ДНК в биологической жидкости. Что позволяет сконцентрировать ДНК и отделить ее от избытка белков биологических жидкостей с последующим осаждением комплекса ДНК-пептид центрифугированием.

Таким образом, вместо процедуры ферментативной обработки пробы и её

существенного разбавления лизисным, а затем и связывающим буферами, мы путем одной быстрой процедуры получили концентрированный в виде осадка и очищенный от белка биологической жидкости комплекс вкДНК-полилизин.

Суспензия сорбента - частиц магнетита, покрытых слоем силикагеля, общим диаметром 1,5 микрона не обладает неспецифической сорбцией ДНК. Это позволяет исключить использование синтетической РНК и что, в конечном счете, обеспечивает более высокую чистоту искомого препарата ДНК. А при добавлении связывающего буфера и суспензии сорбента к осадку комплекса ДНК-полилизин, происходит его диссоциация, связывание ДНК с сорбентом и высвобождение термического полилизина в водную фазу.

Все это позволяет существенно время выделения ДНК и повысить ее выход и чистоту.

Состав набора для выделения ДНК:

Набор состоит из 4-х растворов и суспензии сорбента, каждый из которых находится в отдельной пробирке и добавляется отдельно в реакционную смесь в соответствии с нижеприведенной методикой выделения ДНК, а также инструкции по выделению ДНК. Пробирки с ингредиентами набора находятся в картонной коробке с ячейками для их вертикального расположения.

Набор имеет следующий состав.

1. ДНК-аффинный полипептид (термический полилизин с молекулярной массой 10-30 килодальтон) - 50 мл.
2. Связывающий буфер (5,5 М гуанидинтиоцианат, 5 мМ Трилон Б, 10 мМ Трис-НСI рН 8,0) – 50 мл.
3. Отмывочный буфер (80% этанол) - 50 мл.
4. Элюирующий буфер (10 мМ Трис-НСI и 1 мМ Трилона Б с рН 8,5) -1 мл.
5. Сорбент (10% суспензия магнетита, покрытого слоем силикагеля с размером частиц 1,5-2 мкм в растворе 0.5 М хлористого натрия) - 2 мл.

Примеры использования набора

Пример 1

Для иллюстрации получения геномной ДНК приводим пример №1 - выделение ДНК из клеток крови человека с использованием данного набора. Осадок белых клеток крови, полученных из 1 мл цельной крови, растворяли в 20 мкл лизисного буфера, после чего добавляли 100 мкл связывающего буфера, смесь перемешивали и добавляли 30 мкл суспензии сорбента, вновь перемешивали и оставляли на 10 мин при комнатной температуре, после чего добавляли 0,5 мл отмывочного буфера, перемешивали и центрифугировали при 5000 об/мин в течение 1 мин. Супернатант тщательно отбирали и отбрасывали, а к осадку добавляли 30 мкл элюирующего буфера, смесь пипетировали и помещали на 20 мин в водяную баню при +60°C, после чего центрифугировали при 5000 об/мин в течение 1 мин. Отбирали содержащий ДНК супернатант и измеряли концентрацию ДНК с помощью флуориметра. Выход обычно составлял 5-20 нг ДНК из 1 мл плазмы крови, что соответствует максимальной величине. Технический результат настоящего изобретения состоит в упрощении и ускорении получения внеклеточной ДНК из биологических жидкостей (плазма крови, моча, слюна) за счет связывания, агрегации и осаждения ДНК. Этот результат достигается тем, что в известном способе получения ДНК, включающем добавление к 1 части биологической жидкости 0,1 части раствора термального полилизина (10 мг/мл), тщательном перемешивании смеси в течение 10 мин и осаждения комплекса ДНК-термальный полилизин центрифугированием при 14 000 g в течение 5 минут.

На рисунке 1 представлена сравнительная эффективность выделения внеклеточной

ДНК из плазмы крови набором-прототипом Qiagen - QIAamp Circulating Nucleic Acid kit (рис. 1 А) и нашим набором (рис.1 Б), оцененные методом флуоресценции (набор реагентов Qubit dsDNA HS Assay Kit и флуориметр Qubit 4) и количественной ПЦР (ABI 7500 Fast Real Time PCR). Флуоресцентный метод показал, что оба набора выделяют

5 одинаковое в пределах погрешности измерений количество ДНК, тогда как функциональный тест - количественная ПЦР оказал, что наш набор выделяет на 34,6% больше ДНК, что может быть связано с наличием ингибиторов полимеразы в препарате ДНК полученным с помощью набора Qiagen, либо с различиями состава популяции ДНК полученных двумя наборами. Для проверки этого мы проверили спектры ДНК

10 выделенных этими наборами. Так как внеклеточная ДНК биожидкостей сильно деградирована и ее размер составляет порядка 150 пар оснований и менее, очень важным является эффективность выделения коротких фрагментов менее 100 пар оснований (п.о.). Эффективность выделения наборов оценивали, используя в качестве реперной ДНК смесь низкомолекулярных фрагментов ДНК разной длины известного размера

15 (Ultra Low Range DNA ladder, Thermo Fisher), добавленных в мочу перед выделением нашим набором и набором Qiagen относительно исходной смеси фрагментов ДНК.

После выделения из мочи ДНК разделяли электрофорезом в 10% полиакриламидном геле, окрашивали флуоресцентным красителем SYBR Green, фотографировали в УФ-свете и площади пиков оцифровывали (программа ImageQuant 7.0, Cytiva).

20

Длина фрагмента ДНК	Эффективность Наш набор (А)	Эффективность Набор Qiagen (Б)
100 п.о.	100%	100%
75 п.о.	98.7%	69.9%
50 п.о.	55.9%	34.9%
35 п.о.	35.3%	0.4%

25

Результаты суммированы в Таблице 1, они свидетельствуют о том, что оба набора с одинаковой эффективностью выделяют фрагменты ДНК размером 100 пар оснований, фрагменты ДНК размером 75 п.о. выделяются нашим набором на 30% больше чем

30 Qiagen, разница еще ощутимее при рассмотрении результатов выделения фрагмента 50 п.о., а фрагменты ДНК размером 35 п.о. набор Qiagen практически не выделяет, тогда как наш набор извлекает 35,3% этих фрагментов.

35

Важным критерием чистоты полученной с помощью набора вкДНК, является величина примеси белка и РНК. На рис.2 представлены результаты количественного измерения белка с помощью высокочувствительного флуоресцентного метода Qubit Protein Assay Kit и флуориметра Qubit 4 (Invitrogen). Содержание белка в препарате вкДНК из плазмы крови, выделенной набором компании Qiagen (рис. 2 А) составило 4,9 мкг, тогда как в препарате вкДНК из плазмы крови выделенным нашим методом примесь белка была в 2 раза меньше и составила 2,4 мкг (рис. 2 Б).

40

Содержание примесной РНК в препаратах вкДНК измеряли высоко чувствительным и специфичным флуоресцентным методом Qubit RNA HS Assay Kit (Invitrogen). В препаратах вкДНК, выделенных нашим набором примеси РНК не детектировались, тогда как все препараты вкДНК, выделенные набором компании Qiagen содержали примесь РНК порядка 770 нг, что связано с тем, что согласно протоколу компании, в

45 каждую пробу плазмы крови добавляется синтетическая РНК в количестве 1120 нг (QIAamp Circulating Nucleic Acid Handbook, October 2019. QIAGEN). Таким образом, по параметрам чистоты наш набор позволяет получить более высокоочищенную вкДНК, по сравнению с набором компании QIAGEN.

Процедура выделения ДНК набором QIAGEN составляет 2-3 часа, тогда как наша заканчивается в пределах 1 часа, при этом, она не включает стадии ферментативной деградации белка в пробе с помощью протеиназы К, не требует добавления

5 синтетической РНК для блокировки неспецифической сорбции мембраны колонки. Набор QIAGEN требует использования фильтрующих колонок, насадок к колонкам для увеличения объема фильтруемой жидкости, фильтрующего приемника элюата, вакуумного насоса, термостата и центрифуги, тогда как инструментарий нашего набора ограничивается центрифугой и термостатом. По этой причине максимальный объем пробы, процессируемый набором QIAGEN не превышает 5 мл плазмы и 4 мл мочи, тогда как максимальный объем пробы, процессируемый нашим набором составляет 10 45 мл, то есть в 9-11 раз больше и не зависит от природы биологической жидкости. Количество проб, одновременно процессируемых с помощью набора QIAGEN ограничен количеством приемников колонок фильтрующего устройства и составляет 24 образца, тогда как формат нашего набора – сорбент в суспензии – позволяет проводить 15 одновременное выделение 36 и более образцов.

Как видно из приведенных примеров, предлагаемый набор обеспечивает высокий выход внеклеточной ДНК, соответствующий прототипу, при этом время выделения ДНК в 2-3 раза короче, чем у прототипа, на связан с двукратным разведением пробы как у прототипа, что позволяет выделять вкДНК из объемов до 45 мл, не требует 20 использования фильтрующим колонок, насадок и насоса, а также высокую степень чистоты ДНК, что позволяет использовать ее в медицинской практике для диагностических целей.

Предлагаемый набор, по сравнению с известными, имеет ряд существенных преимуществ:

25 1. Использование вместо ферментативной деградации белка в пробе ДНК-осаждающего агента (термический полилизин) обеспечивает получение более чистых препаратов ДНК по сравнению с прототипом.

2. Использование ДНК-аффинного полипептида (термического полилизина) обеспечивает получение более высококачественных препаратов внеклеточной ДНК, 30 обогащенных фрагментами ДНК с более низкой молекулярной массой, которые теряются при выделении прототипом.

Набор разработан в лаборатории геномной инженерии Федерального государственного бюджетного учреждения «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий имени академика А.М. Гранова» Министерства здравоохранения Российской 35 Федерации.

(57) Формула изобретения

Набор для выделения внеклеточной ДНК, состоящий из связывающего буфера на основе 5,5 М гуанидинтиоцианата, 5 мМ Трилона Б, 10 мМ Трис-НСl рН 8,0, 40 отмывочного буфера на основе 80% этанола и элюирующего буфера на основе 10 мМ Трис-НСl и 1 мМ Трилона Б с рН 8,5, отличающийся тем, что дополнительно набор для выделения ДНК содержит ДНК-аффинный полипептид, а именно термический полилизин с молекулярной массой 10-30 килодальтон, и суспензию сорбента - частиц магнетита, покрытых слоем силикагеля, общим диаметром 1,5 микрона.

45

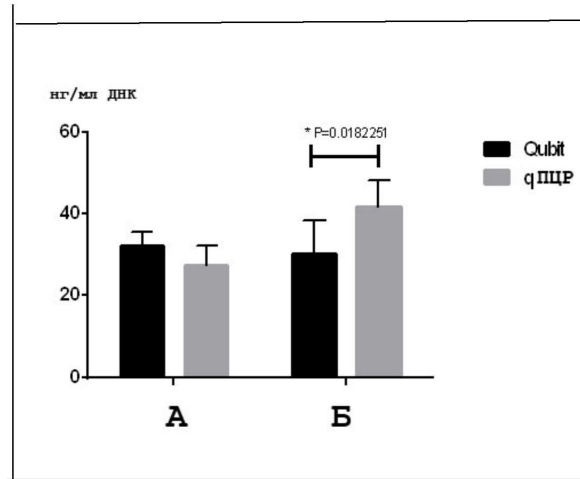


Рис. 1

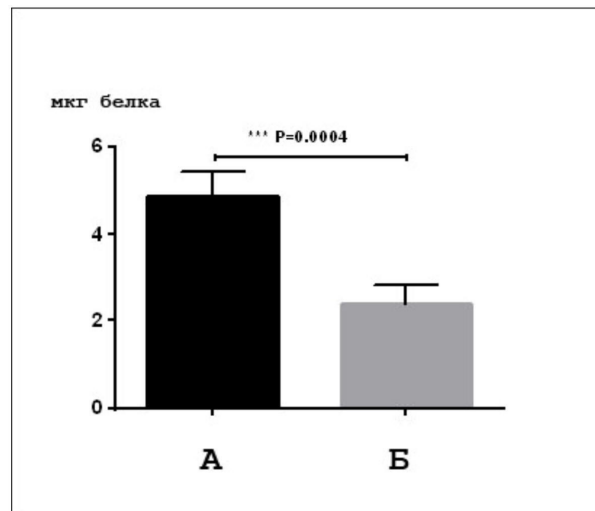


Рис. 2