

ОПТИМИЗАЦИЯ СОРБЦИОННОГО МЕТОДА ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ИЗ СУХИХ ПЯТЕН КРОВИ

Куклина Н.Г.^{1,2}, Авдоница М.А.^{1,2}

¹ Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия, e-mail: NKuklina@cspfmba.ru

² Научно-исследовательский институт медицины труда им. академика Н.Ф. Измерова, Москва, Россия

Аннотация.

Сухие пятна крови широко используются в молекулярной диагностике для выявления различных заболеваний. В процессе выделения ДНК могут возникать различные проблемы, вследствие недостаточного количества образца после десорбции образца с матрицы.

Цель работы - оптимизация протокола сорбционного метода выделения ДНК из сухих пятен крови.

Материалы и методы – образцы периферической крови (N=30). Экстракция ДНК из образцов сухих пятен крови проводилась методом сорбции. Концентрацию выделенной ДНК измеряли спектрофотометрическим и флуориметрическим методами. Статистическая обработка данных проводилась с использованием программного обеспечения Microsoft Excel 2010 и StatTech v.4.7 (разработчик ООО «СтатТех», Россия). Различия считались значимыми при $p < 0,05$.

Результаты. В ходе проведенных экспериментов были проанализированы: концентрация выделенной ДНК спектрофотометрическим и флуориметрическим методами, спектральные характеристики A260/280, а также эффективность выделения ДНК из образцов сухих пятен крови. Наиболее высокие значения Ct и соотношение 260/280 показал метод оптимизации протокола с однократной второй отмывкой сорбента. Статистически достоверных различий между проанализированными методами оптимизации протокола выделения не выявлено.

Заключение. На основании экспериментальных данных, демонстрирующих несущественные различия в анализируемых параметрах, можно сделать вывод о возможности использования метода для выделения ДНК из сухих пятен крови без оптимизации протокола.

Ключевые слова: сухие пятна крови, выделение ДНК, сорбционный метод.

OPTIMIZATION OF THE SORPTION METHOD OF DNA ISOLATION FROM DRY BLOOD SPOTS

Kuklina N.G.^{1,2}, M.A. Avdonina^{1,2}

¹*Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks of the FMBA, Moscow, Russia, e-mail: NKuklina@cspfmba.ru*

²*Izmerov Research Institute of Occupational Health, Moscow, Russia*

Dry blood spots are widely used in molecular diagnostics to detect various diseases. Various problems may arise during DNA isolation due to insufficient sample quantity after desorption of the sample from the matrix. The aim of the work is to optimize the protocol of the sorption method for DNA extraction from dry blood spots.

Materials and methods – peripheral blood samples (N=30). DNA extraction from samples of dry blood spots was carried out by sorption. The concentration of isolated DNA was measured by spectrophotometric and fluorimetric methods. Statistical data processing was carried out using Microsoft Excel 2010 and StatTech v.4.7 software (developed by Stattech LLC, Russia). The differences were considered significant at $p < 0.05$.

Results. During the experiments, the concentration of isolated DNA by spectrophotometric and fluorimetric methods, spectral characteristics of A260/280, as well as the effectiveness of DNA isolation from samples of dry blood spots were analyzed. The highest Ct values and the 260/280 ratio were shown by the protocol optimization method with a single second sorbent wash. There were no statistically significant differences between the analyzed methods of optimizing the allocation protocol.

Conclusion. Based on experimental data demonstrating insignificant differences in the analyzed parameters, it can be concluded that the method can be used to isolate DNA from dry blood spots without optimizing the protocol.

Keywords: dry blood spots, DNA extraction, sorption method

Введение

Использование сухих пятен крови (СПК) в качестве клинических образцов для проведения молекулярно-биологических исследований получило свое распространение в 60-х годах 20 века и с тех пор является одним из надёжных инструментов в клинической лабораторной диагностике. По сравнению с забором крови из вены, получение капли крови

является менее инвазивным методом и требует минимального объёма крови – 30-50 мкл, что особенно важно при работе с новорождёнными, детьми и пациентами с анемией. При этом такие образцы обладают достаточно высокой стабильностью, даже в течение нескольких лет, и не требуют особого температурного режима при хранении и транспортировке, что играет значительную роль при молекулярно-генетических исследованиях в отдалённых и труднодоступных регионах [1, 2, 3].

В настоящее время применение сухих пятен крови охватывает широкий спектр различных направлений, таких как неонатальный скрининг (выявление наследственных заболеваний), молекулярно-генетические исследования инфекционных заболеваний (ВИЧ, гепатит). В судебно-медицинской экспертизе используются при идентификации личности, установлении отцовства, генетическом профилировании. В фармакогенетике, ДНК, полученная из сухих пятен крови, позволяет определять генетические особенности пациента, оказывающие влияние на метаболизм лекарственных препаратов, что позволяет персонифицировать лечение, достигать терапевтического эффекта в короткие сроки, а также избегать побочных эффектов. Значительную роль использование сухих пятен крови играет также при создании биобанков, так как не требует огромного количества морозильных камер, занимает достаточно мало пространства, а отсутствие требований к транспортировке позволяет получать образцы из удалённых регионов [4, 5, 6].

Одним из основных типов матриц на которые наносятся пятна крови являются целлюлозно-бумажные FTA карты, представляющие собой специализированный носитель, пропитанный химическими веществами (детергентами, хелатирующими агентами и буферами), которые обеспечивают лизис клеток, стабилизацию и иммобилизацию нуклеиновых кислот и защиту от контаминации. В результате нанесения капли крови на матрицу, ДНК оказывается защищённой от различного рода воздействий, таких как УФ-излучение, влажность, перепады температуры, а также от воздействий ферментов и бактериального роста [6, 7].

Процесс выделения ДНК из сухих пятен крови включает четыре основных этапа – десорбция образца с матрицы, лизис клеток и высвобождение ДНК, очистка ДНК от примесей (белков, полисахаридов и др.), концентрация и элюция ДНК. Эффективность каждого этапа может значительно варьировать в зависимости от типа матрицы и используемого метода экстракции. Несмотря на то, что большинство методов экстракции подходит для проведения реакции ПЦР, для устранения ингибирования может потребоваться оптимизация условий различных этапов выделения из сухих пятен крови [8].

Так, в ряде работ рассмотрены различные проблемы, возникающие в ходе экстракции ДНК из сухих пятен крови, а именно ухудшение качества образца вследствие недостаточной

отмывки, недостаточного количества клеток после десорбции образца с матрицы и ряд других [9, 10].

В разных источниках литературы показано несколько вариантов оптимизаций и модификаций этапов выделения ДНК. К наиболее часто встречающимся относят – увеличение количества дисков (при необходимости получения большого количества ДНК для полногеномного секвенирования), добавление этапа предварительной инкубации диска в небольшом объеме буфера (ТЕ-буфер, вода, элюирующий буфер) с нагреванием или без нагревания, уменьшение объема сорбента, различных буферов экстракции [11, 12, 13].

Цель работы – оптимизация протокола сорбционного метода выделения ДНК из сухих пятен крови.

Материалы и методы.

В исследовании использовали (N=30) образцы цельной периферической крови, полученной методом флеботомии в пробирках с ЭДТА. Процедура забора крови осуществлялась у сотрудников ФГБУ ЦСП ФМБА России после добровольного согласия.

Подготовка образцов.

Для приготовления сухих пятен крови был использован – ДНК-архив (Алкор-Био, Россия) на основе бумажно-целлюлозного волокна.

Для подготовки образцов сухих пятен крови проводили следующие этапы – нанесение капли крови в объёме 50 мкл на каждую матрицу, высушивание в течение 24 часа при комнатной температуре в защищенном от солнечных лучей месте.

Экстракция ДНК.

Экстракция ДНК из образцов сухих пятен крови проводилась набором «ДНК-Сорб» (производство ФГБУ ЦСП ФМБА России) согласно Инструкции производителя и включала в себя несколько этапов – лизис клеток, преципитацию, три последовательные процедуры отмывки и элюирование с помощью ТЕ-буфера. Элюция проводилась в двух объёмах – 35 и 50 мкл.

Для экстракции ДНК из сухих пятен крови предварительно получали панчи диаметром 6 мм, маркировали и помещали каждый в пробирку 1,5 мл типа Эппендорф. Выделение ДНК проводили несколькими протоколами:

1 протокол – выделение согласно стандартному протоколу (СП).

В пробирки с панчами добавляли 100 мкл воды, перемешивали на вортексе и кратко центрифугировали для сброса капель с крышки. Затем добавляли 300 мкл лизирующего буфера и ставили в термостат для инкубации на 5 минут при 65 °С, периодически помешивая. После инкубации пробирки кратковременно центрифугировали для осаждения капель, затем аккуратно переносили надосадочную жидкость, не задевая диск в новую пробирку. В

пробирки добавляли сорбент объёмом 25 мкл и инкубировали при комнатной температуре в течение 7 минут, периодически помешивая. Дальнейшее выделение ДНК проводили согласно Инструкции производителя.

2 протокол - стандартный протокол с 1 отмывкой (СП-1).

В пробирки с панчами добавляли 100 мкл воды, перемешивали на вортексе и кратко центрифугировали для сброса капель с крышки. Затем добавляли 300 мкл лизирующего буфера и ставили в термостат для инкубации на 5 минут при 65 °С, периодически помешивая. После инкубации пробирки кратковременно центрифугировали для осаждения капель, затем аккуратно переносили надосадочную жидкость, не задевая диск в новую пробирку. В пробирки добавляли сорбент объёмом 25 мкл и инкубировали при комнатной температуре в течение 7 минут, периодически помешивая. После инкубирования проводили центрифугирование пробирок и отбирали надосадочную жидкость. С осаждённым сорбентом проводили первую отмывку согласно Инструкции, вторая отмывка проводилась только однократно.

3 протокол - протокол выделения с использованием уменьшенного объёма лизирующего буфера и сорбента (СП/2).

В пробирки с панчами добавлялся лизирующий буфер в объёме 150 мкл, пробирки перемешивали на вортексе и сбрасывали капли центрифугированием. После чего образцы инкубировали в термостате в течение 5 мин при температуре 65 °С, периодически помешивая. После инкубации пробирки кратковременно центрифугировали для осаждения капель, затем аккуратно переносили надосадочную жидкость, не задевая диск в новую пробирку. В пробирки добавляли сорбент объёмом 12,5 мкл и инкубировали при комнатной температуре в течение 7 минут, периодически помешивая. Дальнейшее выделение ДНК проводили согласно Инструкции производителя.

4 протокол - предварительная инкубация СПК в лизирующем буфере в течение 30 минут при температуре 56 °С (СП+30' ЛБ).

В пробирки с панчами добавляли 300 мкл воды, перемешивали на вортексе и кратко центрифугировали для сброса капель с крышки. Затем ставили в термостат для инкубации на 5 минут при 65 °С, периодически помешивая. После инкубации пробирки кратковременно центрифугировали для осаждения капель, затем аккуратно переносили надосадочную жидкость, не задевая диски в новую пробирку. Затем был добавлен сорбент объёмом 25 мкл и инкубировали при комнатной температуре в течение 7 минут, периодически помешивая. Дальнейшее выделение ДНК проводили согласно Инструкции производителя.

5 протокол - предварительная инкубация СПК в воде в течение 20 минут при комнатной температуре (СП + 20' вода).

В пробирки с дисками добавляли 100 мкл деионизированной воды, после чего все пробирки кратковременно перемешивались на вортексе и инкубировались в течение 20 минут при комнатной температуре. Во время инкубации пробирки периодически встряхивались на вортексе. Панчи при этом всегда должны были быть погружены в раствор. После инкубации добавлялся лизирующий буфер и проводилось выделение согласно стандартному протоколу, описанному выше.

6 протокол - предварительная инкубация СПК в ТЕ-буфере в течение 20 мин при комнатной температуре (СП+ 20' ТЕ).

В пробирки с дисками добавляли ТЕ-буфер объемом 100 мкл, после чего кратковременно перемешивали на вортексе и инкубировали в течение 20 минут при комнатной температуре. Во время инкубации пробирки периодически встряхивали на вортексе. Панчи при этом всегда должны быть погружены в раствор. После инкубации в пробирки добавлялся лизирующий буфер и проводили выделение согласно стандартному протоколу.

В качестве набора сравнения был использован оптимизированный протокол для выделения ДНК из сухих пятен крови к набору «DNeasy Blood & Tissue Kit» («Qiagen», США). Согласно Инструкции производителя, основное отличие от стандартного протокола – длительная инкубация в буфере сначала 15 минут при температуре 90 °С, а затем 60 минут при температуре 56 °С.

Концентрацию выделенной ДНК измеряли спектрофотометрическим и флуориметрическим методами с использованием спектрофотометра/флуориметра DeNovix DS-11 FX («DeNovix Inc.», США). Каждый образец был измерен в трёх повторях при комнатной температуре.

Оценку качества полученной ДНК проводили с помощью ПЦР-РВ. Праймеры и флуоресцентный зонд были подобраны на ген домашнего хозяйства *ABL1* с помощью программы Primer3, синтез был проведен в АО «ГенТерра» (Россия). Смесь для ПЦР-РВ содержала все необходимые компоненты, а именно: смесь праймеров и зондов – 10 мкл, ПЦР-буфер – 5 мкл, dNTP – 0,5 мкл, Taq-полимераза – 0,5 мкл (производство ЦСП ФМБА, Россия).

Реакция амплификации проводилась с использованием амплификатора CFX 96 (BioRad, США) по следующей программе: 95 °С – 15 мин, затем 45 циклов – 95 °С 15 сек, 60 °С – 60 сек. Детекция флуоресцентного сигнала осуществлялась по каналу HEX. Оценка полученных сигналов проводилась с учетом корректного прохождения положительных и отрицательных контролей. В качестве положительного контроля использовалась плаزمид с искусственно синтезированной вставкой, в качестве отрицательного контроля – деионизированная вода. Для повышения точности и надежности результатов каждый образец был исследован в трёх повторях.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программного обеспечения Microsoft Excel 2010 и StatTech v.4.7 (разработчик ООО «СтатТех», Россия). Различия считались значимыми при $p < 0,05$.

Результаты.

Концентрация ДНК, измеренная спектрофотометрическим и флуориметрическим методами, коэффициенты чистоты A260/280 и A260/230, показатели Ct представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Сравнительные результаты полученных данных

Метод	1 протокол (СП)	2 протокол (СП-1)	3 протокол (СП/2)	4 протокол (СП+ 30' ЛБ)	5 протокол (СП+ 20' вода)	6 протокол (СП+ 20' ТЕ)
Концентрация ДНК (спектрофотометрия), нг/мкл	34,24±1,96	34,46±3,29	23,92±2,11	27,32±0,95	8,03±0,86	16,10±1,48
Концентрация ДНК (флуориметрия), нг/мкл	1,63±0,28	1,75±0,14	1,25±0,20	0,56±0,03	0,15±0,02	0,09±0,04
Спектральные характеристики A260/280	1,27±0,03	1,92±0,12	1,81±0,04	1,77±0,03	2,13±0,09	1,75±0,05
Значение Ct со стандартным отклонением	26,95±1,41	26,85±0,94	28,41±1,35	28,70±0,42	36,75±1,37	32,77±0,72

Таблица составлена авторами на основе собственных данных.

При выделении ДНК из СПК наиболее высокие результаты показали протокол 1 (выделение по стандартному протоколу) 34,24±1,96 нг/мкл (ДИ 95%: 30,4 – 38,07) и протокол 2 (выделение с 1 отмывкой раствора 2) 34,46±3,29 нг/мкл (ДИ 95%: 28,01– 40,9). Снижение концентрации ДНК почти в 1,5 раза было отмечено при использовании протокола 3 (уменьшение лизирующего буфера и сорбента в два раза) 23,92±2,11 нг/мкл (ДИ 95%: 19,79 – 28,04) и протокола 4 (с предварительной инкубацией в ЛБ при 56 °С в течение 30 минут) 27,32±0,95 нг/мкл (ДИ 95%: 25,36 – 29,09).

Использование протоколов 5 (предварительная инкубация в воде 20 минут при комнатной температуре) и 6 (предварительная инкубация в элюенте 20 минут при комнатной температуре) показали наиболее низкие значения концентрации, а именно: 8,03±0,86 нг/мкл (ДИ 95%: 6,35 – 9,71) и 16,10±1,48 нг/мкл (ДИ 95%: 13,10 – 18,9), соответственно.



Рисунок 1. Значения концентрации ДНК, выделенной разными протоколами (составлено авторами по результатам данного исследования).

Результаты анализа спектральных характеристик A260/280 показали высокий уровень чистоты ДНК (рис. 2).

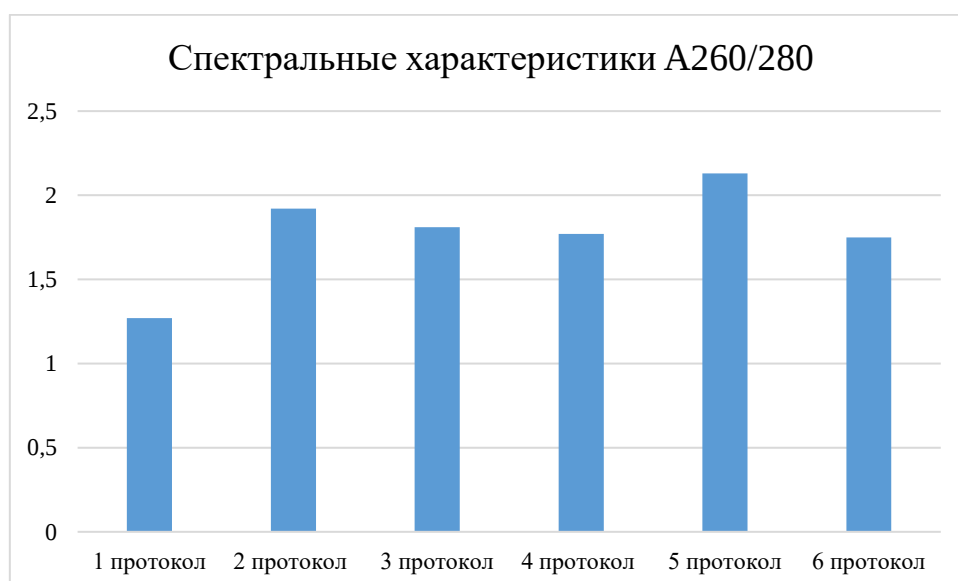


Рисунок 2. Значения спектральных характеристик ДНК, выделенной разными методами (составлено авторами по результатам данного исследования).

Наиболее оптимальный уровень наблюдался при использовании протокола 2 – $1,92 \pm 0,12$ (ДИ 95%: 1,69 – 2,15). При использовании протокола 5 был получен повышенный уровень коэффициента A260/280 – $2,13 \pm 0,09$ (ДИ 95%: 1,94 – 2,30), что говорит о возможном загрязнении белками. Выделение ДНК из СПК протоколами 3, 4, 6 показало одинаковый уровень характеристики A260/280 $1,81 \pm 0,04$ (ДИ 95%: 1,7 – 1,8), $1,77 \pm 0,03$ (ДИ 95%: 1,74 – 1,83),

1,77±0,05 (ДИ 95%: 1,67 – 1,86) соответственно. Самые низкие значения были получены при использовании протокола 1 – 1,27±0,03 (ДИ 95%:1,2 – 1,3).

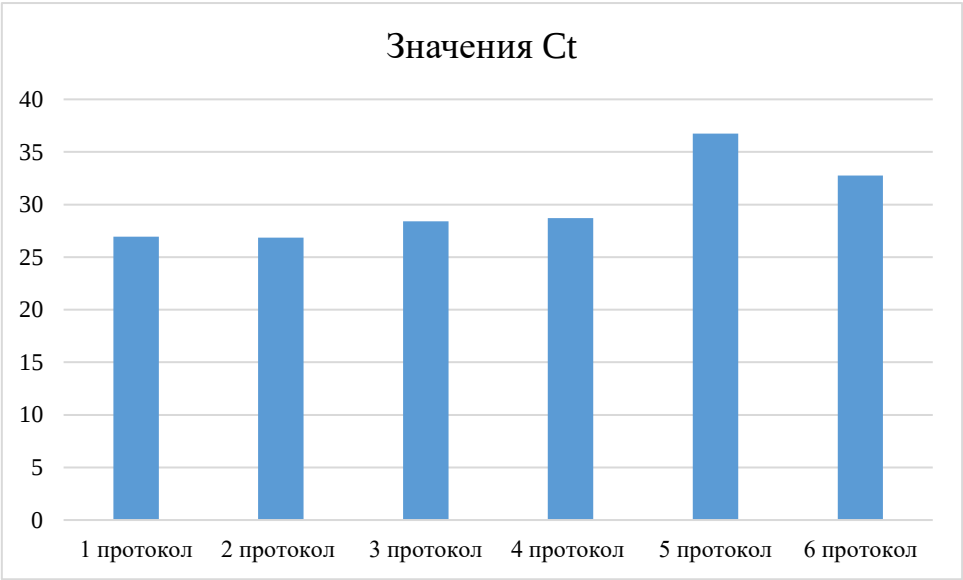


Рисунок 3. Показатели Ct выделенной ДНК разными протоколами (составлено авторами по результатам данного исследования).

При постановке ПЦР наиболее ранние выходы получены на образцах, выделенных 1 протоколом, Ct составляет 26,95±1,41 (ДИ 95%: 26,53 – 27,36) и 2 протоколом – 26,85±0,94 (ДИ 95%:26,53 – 27,36). Поздние значения показали протоколы 5 и 6 – 36,75±1,37 (ДИ 95%:36,3 – 37,14) и 32,77±0,72 (ДИ 95%:32,56 – 32,98) соответственно (рис. 3).

По итогам проведенных экспериментальных работ были выбраны наиболее оптимальные методы выделения – 1, 2 и 3 протоколы.

Для дальнейшей оптимизации проведено выделение ДНК с увеличением объема элюирующего буфера до 50 мкл, а также параллельное выделение набором сравнения «DNeasy Blood & Tissue Kit» согласно оптимизированному протоколу Производителя. Полученные данные представлены в таблице 2.

Таблица 2.

Сравнительные результаты полученных данных с увеличением объема элюции.

Показатели	1 протокол (СП)		2 протокол (СП-1)		3 протокол (СП/2)		Qiagen	
	35 мкл	50 мкл	35 мкл	50 мкл	35 мкл	50 мкл	35 мкл	50 мкл
Концентрация ДНК (спектрофотометрия), нг/мкл	34,24±1,96	65,34±7,41	34,46±3,29	74,94±5,50	23,92±2,11	87,8±6,1	3,55±0,22	2,10±0,13
Концентрация ДНК (флуориметрия), нг/мкл	1,63±0,28	1,99±0,18	1,75±0,14	2,66±0,23	1,25±0,20	1,4±0,1	1,56±0,08	0,99±0,07

Спектральные характеристики A260/280	1,27±0,03	1,55±0,02	1,92±0,12	1,53±0,01	1,81±0,04	1,5±0,01	1,32±0,92	1,26±0,04
Значение Ct со стандартным отклонением	26,95±1,41	28,24±1,39	26,85±0,94	27,73±0,73	28,41±1,35	27,6±0,9	30,98±0,67	30,77±0,10

Таблица составлена авторами на основе собственных данных.

Увеличение объема элюирующего буфера до 50 мкл показало незначительное снижение уровня выхода ДНК и значения Ct составили – 28,24±1,39 (ДИ 95%: 27,83 – 28,64), 27,73±0,73 (ДИ 95%: 27,51 – 27,94), 28,41±1,35 (ДИ 95%: 27,40 – 27,90) в 1, 2, 3 методах соответственно. При этом наблюдалось увеличение таких показателей, как концентрация, измеренная спектрофотометрическим и флуорометрическим методами, а также спектральная характеристика 260/280 (табл. 2).

Применение t-критерия Стьюдента в анализе данных составило более 0,05, для всех исследуемых показателей, что свидетельствует о статистической недостоверности различий между анализируемыми оптимизированными протоколами выделения ДНК из сухих пятен крови.

Обсуждение.

Использование ДНК, полученной при выделении из сухих пятен крови, является важной составной частью молекулярно-биологического исследования, от которой зависит получение валидных результатов. Применение ФТА-карт имеет ряд преимуществ перед использованием цельной крови – малоинвазивность забора материала, способность сохранять ДНК при длительном хранении в комнатной температуре (в течение нескольких лет), удобство транспортирования (не занимает много места и не требует специальных температурных условий), а также возможность использования 1 образца несколько раз, не подвергая его многократным циклам заморозки/разморозки.

В настоящее время существует множество различных протоколов выделения ДНК из сухих пятен крови с помощью разных методов.

В исследовании (2017) Горбенко А.С. описывал оптимизированную процедуру выделения ДНК с использованием сорбционного метода, в ходе которого к сухим пятнам крови, помещенным в пробирку, был добавлен лизирующий раствор, а затем проводилось инкубирование при температуре 65 °С в течение 1 часа. Сравнительный анализ выделения из цельной крови и сухих пятен крови показал высокую корреляцию между образцами цельной крови и сухих пятен [14].

Седых А.В. и др. (2023) провел сравнение различных наборов для выделения ДНК из сухих пятен крови (с использованием магнитной силики и метода спирового осаждения НК)

по следующим критериям – эффективность анализа ПЦР, чистота ДНК (A260/280), концентрация ДНК, измеренная спектрофотометрическим методом, а также время анализа и количество этапов, входящих в протокол. В ходе экспериментов было продемонстрировано, что все четыре набора реагентов показали достаточно высокие уровни выбранных критериев и могут применяться на практике в молекулярно-биологических исследованиях [15].

Van Biesen N. et al. (2025) проводила сравнение пяти различных методов выделения ДНК из образцов сухих пятен крови – три различных метода выделения на основе колонок и два метода на основе нагревания с использованием буфера TE и с использованием смолы Chelex-100. Было показано низкая концентрация ДНК при использовании колоночного метода выделения (2,10 нг/мкл, (ДИ 95%:1,67 – 2,53), показатель чистоты 260/280 составил 1,72 (ДИ 95%: 1,37 – 2,07) и 260/230 - 0,33 (ДИ 95%: 0,26 – 0,39), что подтверждается полученными результатами (табл. 2) [8].

В ходе экспериментов по оптимизации объёма элюирующего буфера было продемонстрировано, что использование колоночного метода, с меньшим объёмом элюирования увеличивает концентрацию выделенной ДНК, по сравнению с другими методами, что также демонстрируют эксперименты, проведённые Van Biesen N. [8].

Kumar A. et al. в 2019 году проводил оптимизацию экстракции ДНК с помощью предварительной инкубацией в растворе PBS (200 мкл) в течение ночи при комнатной температуре, последующей экстракцией с использованием колоночного метода (QIAamp DNA, Qiagen) и с помощью набора реагентов на магнитных частицах (ChargeSwitch Forensic DNA Purification Kit, Invitrogen). В результате проведенных экспериментов не наблюдалось увеличения концентрации геномной ДНК и при этом был продемонстрирован большой разброс в значениях концентрации (64,8 - 720 нг) и спектральной характеристики 260/280 – 1,8-2,9 [16].

Выбранный авторами протокол выделения ДНК основан на сорбционном методе, так как он достаточно широко применяется в клинической практике благодаря своей эффективности и простоте. Он включает в себя следующие этапы: лизис клеток, во время которого происходит разрушение клеточных мембран и высвобождение ДНК, связывание сорбента и ДНК, отмывка связанной с сорбентом ДНК от различных примесей – белков, липидов и других веществ, элюция в TE-буфере (отделение ДНК от сорбента). Протоколы оптимизации включали в себя такие изменения, как предварительная инкубация в различных растворах, изменение объёма лизирующего буфера и сорбента, удаление одной отмывки, а также изменение объёма элюирующего буфера.

Заключение.

Метод выделения ДНК из сухих пятен крови на картах ФТА является надёжным, простым, безопасным и экономичным инструментом для сбора, хранения и анализа ДНК. Его ключевые преимущества, а именно: стабильность образцов, инаktivация патогенов и простота выделения, обеспечили ему широкое применение в научных исследованиях и практических областях, от криминалистики до клинической диагностики. Хотя метод имеет некоторые ограничения (количество ДНК, фрагментация, потенциальные ингибиторы), возможность оптимизации протоколов выделения, включая автоматизацию и адаптацию для NGS, расширяет сферы его использования.

Полученные в ходе экспериментов результаты показывают незначительные расхождения в анализируемых показателях, что говорит о возможности использования данного метода для выделения ДНК из сухих пятен крови без оптимизации протокола.

Карты ФТА остаются незаменимым решением для задач, требующих надежного сбора, транспортировки, долгосрочного хранения и быстрого получения пригодной для ПЦР ДНК из образцов цельной крови.

Список литературы

1. Самсонова Ж.В., Саушкина Н.Ю., Осипов А.П. Сухие образцы биологических жидкостей на пористых мембранах – перспективный метод пробоподготовки для биомедицинской и ветеринарной диагностики // Журнал аналитической химии. 2022. Т. 46. С. 456-698. DOI: 10.31857/S0044450222040119
2. Simon N., Shallat J., Wietzikoski C.W., Harrington W.E. Optimization of Chelex 100 resin-based extraction of genomic DNA from dried blood spots // *Biology Methods and Protocols*. 2020. Vol. 5. Is 1, P. 1–7. <https://doi.org/10.1093/biomethods/bpaa009>
3. Долудин Ю.В., Лимонова А.С., Козлова В.А., Ефимова И.А., Борисова А.Л., Мешков А.Н., Покровская М.С., Драпкина О.М. Сбор и хранение ДНК-содержащего биоматериала и выделенной ДНК // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2020. Т. 19(6). С. 2730. <https://doi.org/10.15829/1728-8800-2020-2730>
4. Сайтгалина М.А., Останкова Ю.В., Седых А.В., Тотолян Арег А. Особенности преаналитического этапа при количественном определении TREC/KREC в периферической крови // Медицинская иммунология. 2023. Т. 25, № 6. С. 1441-1452. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/osobennosti-preanaliticheskogo-etapa-pri-kolichestvennom-opredelenii-trec-krec-v-perifericheskoy-krovi> doi: 10.15789/1563-0625-FOT-2909

5. Moat S.J., George R.S., Carling R.S. Use of Dried Blood Spot Specimens to Monitor Patients with Inherited Metabolic Disorders // *Int J Neonatal Screen*. 2020. V. 26. № 6(2). P. 26. doi: 10.3390/ijns6020026
6. Malsagova K., Kopylov A., Stepanov A., Butkova T., Izotov A., Kaysheva A. Dried blood spot in laboratory: Directions and prospects // *Diagnostics*. 2020. V. 10. № 3. P. 248. <https://doi.org/10.3390/diagnostics10040248>
7. Smit P.W., Elliott I., Peeling R.W., Mabey D., Newton P.N. An overview of the clinical use of filter paper in the diagnosis of tropical diseases // *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2014. V. 90. № 2. P. 195. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0463>
8. Van Biesen N., Cools P., Meyers E. Comparison and optimization of DNA extraction methods for human DNA from dried blood spot samples // *Pediatr Rep*. 2025. Vol. 4. Is. 17(2). P. 30. doi: 10.3390/pediatric17020030
9. Dobbs L.J., Madigan M.N., Carter A.B., Earls L. Use of FTA gene guard filter paper for the storage and transportation of tumor cells for molecular testing // *Arch Pathol Lab Med*. 2002. V. 126. № 1. P. 56-63. doi: 10.5858/2002-126-0056-UOFGGF.
10. Bezerra C.S., Portilho M.M., Frota C.C., Villar L.M. Comparison of four extraction methods for the detection of hepatitis B virus DNA in dried blood spot samples // *Microbiologyopen*. 2021. V. 10. № 2. P. 1161. doi: 10.1002/mbo3.1161.
11. Choi E.H., Lee S.K., Ihm C., Sohn Y.H. Rapid DNA extraction from dried blood spots on filter paper: potential applications in biobanking // *Osong Public Health Res Perspect*. 2014. Vol. 5. Is. 6. P. 351-7. <https://doi: 10.1016/j.phrp.2014.09.005>
12. Hendrix M.M., Cuthbert C.D., Cordovado S.K. Assessing the performance of dried-blood-Spot DNA extraction methods in next generation sequencing // *Int. J. Neonatal Screen*. 2020. V. 6. P. 36. <https://doi.org/10.3390/ijns6020036>
13. Li J., Ulloa G.M., Mayor P., Robles Santolalla M.L., Greenwood A.D. Nucleic acid degradation after long-term dried blood spot storage // *Molecular Ecology Resources*. 2024. V. 24, P. 13979. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13979>
14. Горбенко А.С., Столяр М.А., Ольховский И.А. К вопросу о валидации метода определения соматических мутаций в генах янускиназы-2 (JAK2V617F), кальретикулина (CALR) и рецептора тромбопоэтина (MPL) в образцах сухих капель крови // Лабораторная служба. 2017. Т. 6(3). С. 178-181. DOI: 10.17116/labs201763178-181
15. Седых А.В., Сайтгалина М.А., Останкова Ю.В., Тотолян А.А. Сравнительный анализ наборов реагентов для выделения ДНК из сухих пятен крови // Медицинская иммунология. 2023. Т. 25(6). С. 1453-1462. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-CAO-2895>

16. Kumar A., Mhatre S., Godbole S., Jha P., Dikshit R. Optimization of extraction of genomic DNA from archived dried blood spot (DBS): potential application in epidemiological research & bio banking // *Gates Open Res.* 2019. Vol. 2. P. 57.
[https://doi: 10.12688/gatesopenres.12855.2](https://doi.org/10.12688/gatesopenres.12855.2)