

# Сравнение эффективности полногеномной амплификации деградированной ДНК с использованием коммерческих наборов

Сабилова А.Р., Кравцова О.А.

ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

*Работа выполнена при финансовой поддержке ФГБУ «Фонд содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере», №6090ГУ/2015*

Последние несколько лет предложено несколько методов полногеномной амплификации ДНК (whole genome amplification, WGA) из образцов единичных клеток (напр., при экстракорпоральном оплодотворении) или высоко деградированных образцов (напр., при исследовании объектов в судебно-генетической экспертизе и палеогенетике). В данном исследовании проведен сравнительный анализ эффективности коммерческих наборов для WGA «GenomePlex Complete WGA kit» (Sigma) и «Repli-G Midi kit» (Qiagen). Показано, что наименьшее количество мисматчей, как при анализе микросателлитных локусов ядерной ДНК, так и при секвенировании участка D-петли митохондриальной ДНК, наблюдается при использовании коммерческого набора «GenomePlex Complete WGA kit».

*Ключевые слова:* генетический анализ, деградированная ДНК, полногеномная амплификация, Sigma, Qiagen

## 1. Введение

Одной из актуальных проблем при исследовании деградированных образцов ДНК, таких как объекты биологического происхождения с вещественные доказательств или образцы древней ДНК, или малых ее количеств (напр., единичные клетки при экстракорпоральном оплодотворении), является возможность накопления генетического материала методами полногеномной амплификации (WGA) [1].

На сегодняшний день описано несколько подходов для WGA, таких как DOP-PCR [2], PEP-PCR [3] и MDA [4], при этом некоторые из них представлены коммерчески доступными наборами таких фирм, как Sigma Aldrich и Qiagen.

Целью данного исследования явилось сравнение эффективности полногеномной амплификации искусственно деградированных образцов ДНК с использованием коммерческих наборов.

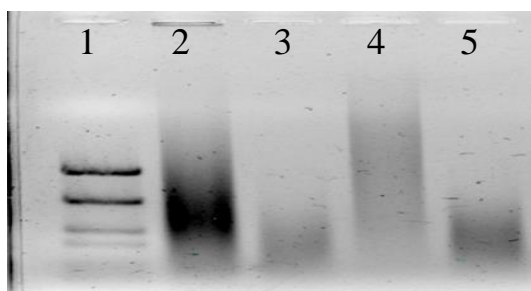
## 2. Материалы и методы

Для создания деградированных образцов проводили расщепление высокомолекулярной ДНК, выделенной из лейкоцитов периферической крови методом фенол-хлороформной экстракции с использованием ультразвука на ультразвуфикаторе Covaris S220. Качество и количество выделенных образцов ДНК оценивали спектрофотометрически и методом электрофореза в 1% агарозном геле. Полногеномную амплификацию проводили с использованием коммерческих наборов «GenomePlex Complete WGA kit» (Sigma) и «Repli-G Midi kit» (Qiagen) согласно инструкции фирм-производителей. Эффективность WGA оценивали на основе амплификации аутосомных и Y-хромосомных микросателлитных локусов с использованием коммерческих наборов IDPlex (Qiagen, Германия) и PowerPlexY23 (Promega, США), а также секвенирования

участка D-петли митохондриальной ДНК размером 467 п.н. (15989-16410) до и после деградации высокомолекулярных образцов. Для постановки реакции секвенирования использовали коммерческий набор для циклического секвенса BigDye Terminator v3.1. (Qiagen, Германия) для ABI PRISM 3730 (Applied Biosystems). Статистическую обработку данных проводили с помощью программного обеспечения MS Excel 2010.

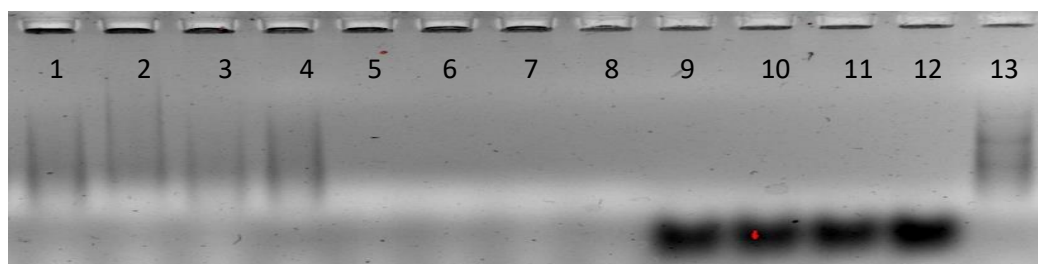
### 3. Результаты исследования

Для получения деградированных образцов провели ультразвуковое воздействие на препараты высокомолекулярной ДНК, выделенных из лейкоцитов периферической крови человека. Деградацию высокомолекулярной ДНК осуществляли в течение 60 секунд, после чего проводили электрофоретическую оценку полученных образцов (рисунок 1).



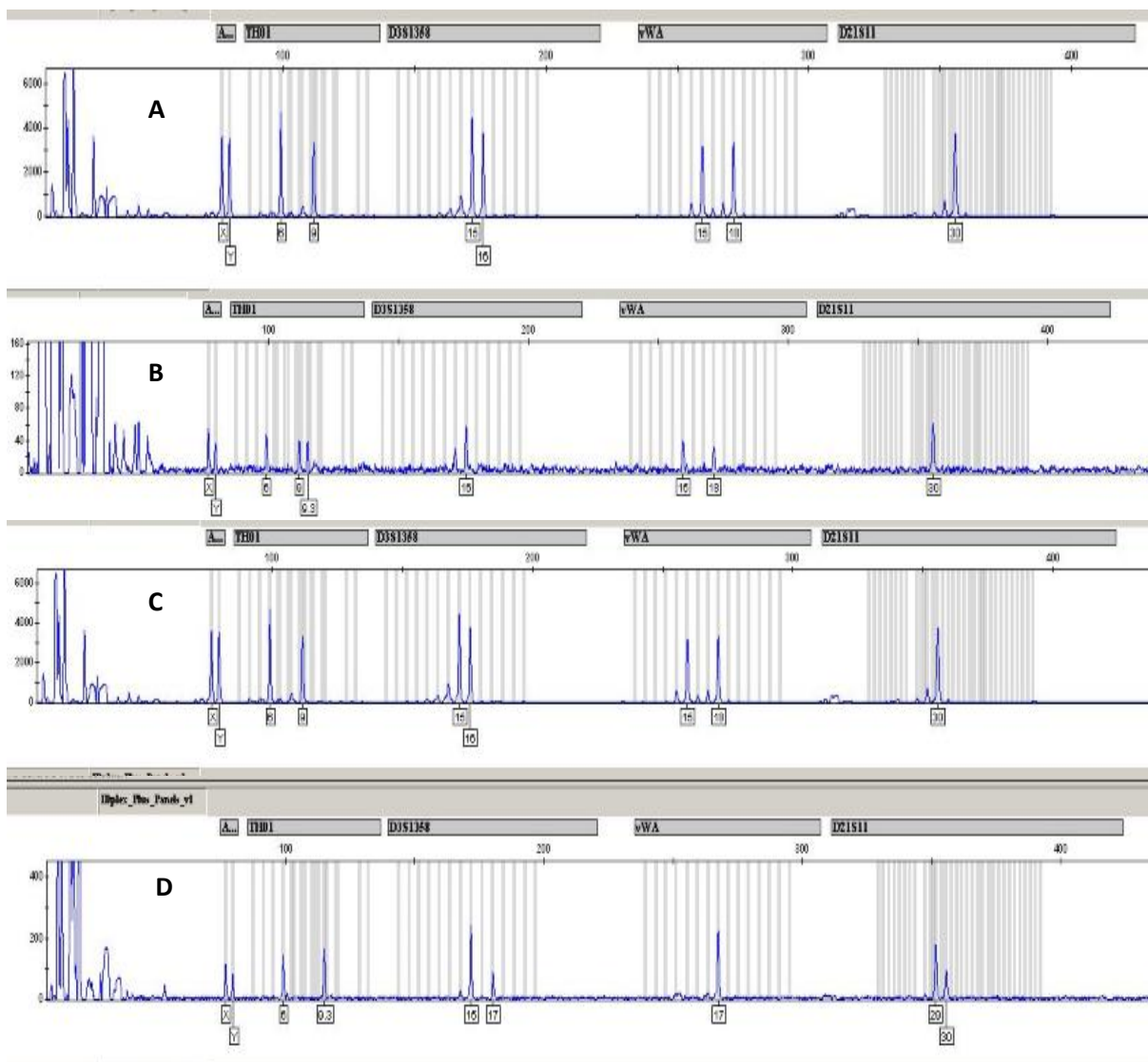
**Рис. 1.** Электрофореграмма, показывающая степень деградации высокомолекулярных образцов ДНК до и после ультразвукового воздействия. 1 - маркер молекулярного веса (1 kb), 2,4 – высокомолекулярный образец ДНК; 3,5 – образцы ДНК после ультразвукового воздействия.

На полученной матрице деградированной ДНК проведены реакции WGA на основе использования коммерческих наборов «GenomePlex Complete WGA kit» (Sigma) и «Repli-G Midi kit» (Qiagen). Электрофоретическое разделение полученных после WGA образцов ДНК представлены на рисунке 2.



**Рис. 2.** Электрофореграмма образцов деградированной ДНК после проведения реакции WGA. 1-4 – ДНК после коммерческой реакции GenomePlex Complete WGA; 5-8 – ДНК после коммерческой реакции REPLI-g Midi kit; 9-12 – образцы ДНК, подвергшиеся искусственной деградации, 13 - маркер молекулярного веса (1 kb).

При анализе данных, полученных в результате амплификации аутосомных (таблица 3) и Y-STR локусов, а также на основе данных секвенирования D-петли мтДНК показано, что при полногеномной амплификации с использованием набора фирмы Sigma наблюдается меньшее количество ошибок по сравнению с альтернативным коммерческим набором «Repli-G Midi kit» (таблица 1).



**Рис. 3.** Фрагменты электрофоретического разделения продуктов амплификации аутосомных STR локусов до и после полногеномной амплификации. А – высокомолекулярная ДНК, В – искусственно деградированная ДНК, С – полногеномная амплификация с использованием набора GenomePlex Complete WGA, D – полногеномная амплификация с использованием набора Repli-G Midi kit.

**Таблица 1.** Процент мисматчей при полногеномной амплификации искусственно деградированной ДНК с использованием коммерческих наборов

Метод WGA	% несовпадений по отношению к высокомолекулярной ДНК		
	Аутосомные микросателлиты	Y-STR	секвенирование Д-петли мтДНК
REPLI-g Midi kit	46	22	53
GenomePlex Complete WGA	0	0	0,5

Таким образом, на модели искусственно деградированных образцов ДНК (размер которых не превышает 500 п.н.) показана наибольшая эффективность полногеномной амплификации с использованием коммерческого набора «GenomePlex Complete WGA kit» фирмы Sigma.

## Список литературы

1. Barber, A.L., Foran D.R. The utility of whole genome amplification for typing compromised forensic samples // Journal of forensic sciences. - 2006. - V.6. - P. 1344-1349.
2. Alsmadi, O. Specific and complete human genome amplification with improved yield achieved by phi29 DNA polymerase and a novel primer at elevated temperature // BMC Research Notes. - 2009. – V.10. - P. 30-39.
3. Arneson, N., S. Hughes S., R. Houlston R., Done Cold S. Whole-Genome Amplification by Degenerate Oligonucleotide Primed PCR (DOP-PCR) // Spring Harb Protoc. – (2013) a. – V.20. - P. 20-40.
4. Arneson, N., S. Hughes S., R. Houlston R., Done Cold S. Whole-Genome Amplification by Improved Primer Extension Pre-amplification PCR (I-PEP-PCR) // Spring Harb Protoc. – (2013) b. – V.13. - P. 56-70.