

 pismavavilov.ru

DOI 10.18699/letvjgb-2024-10-20

Оригинальное исследование

Сравнение наборов для измерения концентрации ДНК методом флуоресценции на нижней границе диапазона измерений

П.С. Орлов^{1, 2✉}, О.П. Хрипко¹, Т.С. Кокорина¹, М.И. Воевода^{1, 2}

Аннотация: В настоящее время необходима замена расходных материалов и реагентов от производителей из США и Евросоюза. В этой работе проводится сравнение наборов для измерения концентрации ДНК методом флуоресценции от производителей из Российской Федерации (Raissol Bio Spectra Q HS) и КНР (Vazyme Equalbit dsDNA HS) с набором производства США (Invitrogen™ Qubit™ dsDNA HS). С использованием данных наборов измерена концентрация ДНК 24 образцов плазмы периферической крови человека. Установлено, что абсолютные значения концентраций ДНК, определенных с помощью трех наборов, имели статистически значимые различия при парных сравнениях. При этом наибольшее медианное значение концентрации ДНК было зафиксировано с применением набора Raissol Bio Spectra Q HS (0.751 нг/мкл) по сравнению с наборами Vazyme Equalbit dsDNA HS (0.498 нг/мкл) и Invitrogen™ Qubit™ dsDNA HS (0.437 нг/мкл). Регрессионный анализ выявил значимые зависимости между концентрациями ДНК, измеренными с помощью различных наборов. Наибольший коэффициент детерминации ($R^2 = 0.93$) был определен при сравнении значений концентраций ДНК, измеренных с использованием наборов Invitrogen:Vazyme. Для оставшихся двух пар, Invitrogen:Raissol и Vazyme:Raissol, коэффициенты детерминации не превышали значения в 0.521. Таким образом, измеренные концентрации ДНК с применением указанных наборов оказались сопоставимы между собой и могут быть пересчитаны относительно друг друга с помощью уравнений регрессии.

Ключевые слова: Qubit™; флуориметрическое измерение концентрации ДНК.

Для цитирования: Орлов П.С., Хрипко О.П., Кокорина Т.С., Воевода М.И. Сравнение наборов для измерения концентрации ДНК методом флуоресценции на нижней границе диапазона измерений. *Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;10(3):177-181. DOI 10.18699/letvjgb-2024-10-20

Финансирование: Исследование выполнено при финансовой поддержке государственного бюджетного проекта FWNR-2022-0021 и государственного бюджетного проекта 123012700001-1.

Original article

Comparison of fluorescence DNA quantification kits at the lower limit of the measurement range

P.S. Orlov^{1, 2✉}, O.P. Khripko¹, T.S. Kokorina¹, M.I. Voevoda^{1, 2}

Abstract: Today, it is necessary to replace consumables and reagents from manufacturers from the USA and the European Union. This work compares kits for measuring DNA concentration by fluorescence from manufacturers from the Russian Federation (Raissol Bio Spectra Q HS) and China (Vazyme Equalbit dsDNA HS) with the original kit manufactured in the USA (Invitrogen™ Qubit™ dsDNA HS). Using the above kits, the DNA concentration of 24 human peripheral blood plasma samples was measured. It was found that the absolute values of DNA concentrations determined using the three kits had statistically significant differences in pairwise comparisons. However, the highest median DNA concentration was recorded using the Raissol Bio Spectra Q HS kit (0.751 ng/μl) compared to the Vazyme Equalbit dsDNA HS (0.498 ng/μl) and Invitrogen™ Qubit™ dsDNA HS kits (0.437 ng/μl). Regression analysis revealed significant relationships between DNA concentrations measured using different kits. The highest coefficient of determination, $R^2 = 0.93$, was determined by comparing DNA concentration values measured using Invitrogen:Vazyme kits. For the remaining two pairs Invitrogen:Raissol and Vazyme:Raissol, the coefficients of determination did not exceed values of 0.521. Thus, the measured DNA concentrations using the specified kits were comparable and can be recalculated relative to each other using regression equations.

¹ Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины, Новосибирск, Россия
Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russia

² Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

 ops86@bionet.nsc.ru

 © Орлов П.С., Хрипко О.П., Кокорина Т.С., Воевода М.И., 2024

sol and Vazyme: Raissol, the coefficients of determination did not exceed 0.521. Thus, the measured DNA concentrations using these kits turned out to be comparable and can be recalculated relative to each other using regression equations.

Key words: Qubit™; fluorescence DNA quantification.

For citation: Orlov P.S., Khripko O.P., Kokorina T.S., Voevoda M.I. Comparison of fluorescence DNA quantification kits at the lower limit of the measurement range. *Pisma v Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Letters to Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;10(3):177-181. DOI 10.18699/letvjgb-2024-10-20 (in Russian)

Funding: The study was carried out with the financial support of the state budget project FWNR-2022-0021 and the state budget project 123012700001-1.

Введение

В настоящее время секвенирование нового поколения широко вошло в повседневную клиническую практику для диагностики и определения тактики лечения. Качество выделенных нуклеиновых кислот в большой степени зависит от различных преаналитических процедур, включающих фиксацию и доставку в лабораторию, а также среды, в которую был забран материал. Поэтому точность количественного определения ДНК играет ключевую роль в успешном проведении тестов.

Количество ДНК в растворе может быть измерено при помощи спектрофотометрии (Glasel, 1995; Huberman, 1995; Manchester, 1995), однако данный метод имеет ряд существенных недостатков. Во-первых, поглощение в ультрафиолетовом спектре не является избирательным в отношении ДНК, РНК или белка. Во-вторых, поглощение находится в сильной зависимости от различных загрязнителей. В-третьих, точность измерения таким методом, как правило, недостаточна при низких концентрациях ДНК. В качестве альтернативного метода определения количества ДНК в растворе, не имеющего таких недостатков, широко используется метод количественного анализа на основе флуоресценции (Le Pecq, Paoletti, 1966; Karuscinski, 1995; Singer et al., 1997; Jones et al., 1998).

Преимущество технологии флуориметрического измерения ДНК перед спектрофотометрической – точность определения концентрации. Так, погрешность измерения для флуориметров составляет 1 %, в отличие от 5 %, характерных для спектрофотометрических методов измерения ДНК (Bonin et al., 2010; Turashvili et al., 2012; Sah et al., 2013). Этот метод особенно востребован для анализа свободно циркулирующей ДНК плазмы крови, так как ее концентрация относительно невысока. Для пациентов с коронавирусной инфекцией COVID-19, сыворотка крови которых была использована в нашей работе, по данным разных авторов, колеблется в пределах от 0.1 до 6.5 нг/мкл, в зависимости от клинической картины заболевания и возраста пациентов (Hoeter et al., 2023; Mishra et al., 2023). В настоящее время разработано несколько тест-систем для оценки концентрации нуклеиновых кислот с использованием флуориметров. Кроме того, на сегодняшний день возникла необходимость замены недоступных и/или слишком дорогих расходных материалов и реагентов от производителей из США и Евросоюза.

В этой работе проводится сравнение альтернативных наборов для измерения концентрации ДНК методом флуоресценции от производителей из Российской Федерации и КНР с исходным набором производства США.

Материалы и методы

В работе использована плазма периферической крови 24 пациентов с коронавирусной инфекцией COVID-19 с ожидаемой концентрацией ДНК в пределах от 0.1 до 6.5 нг/мкл (Hoeter et al., 2023; Mishra et al., 2023). Кровь собирали в вакуумные пробирки, содержащие антикоагулянт КЗ ЭДТА в количестве 9 мл. После осаждения эритроцитарной массы плазму аликвотировали и замораживали в кельвинаторе при –80 °С.

Для выделения нуклеиновых кислот плазму размораживали. Выделение проводили из 100 мкл при помощи комплекта реагентов для выделения тотальной РНК и ДНК из клинического материала «РИБО-ПРЕП» («АмплиСенс», Россия) согласно инструкции изготовителя. Полученные нуклеиновые кислоты растворяли в 50 мкл буфера, предлагающегося к набору.

Концентрацию ДНК определяли в тонкостенных пробирках для ПЦР, адаптированных для использования с флуориметром Qubit™ (кат. № Q32856, Invitrogen, США). Для построения калибровочной кривой использовали 10 мкл стандарта, для исследования концентрации ДНК – 10 мкл раствора ДНК, выделенного из плазмы крови.

Оценку содержания ДНК набором Qubit™ dsDNA HS (Invitrogen) (далее – Invitrogen) проводили согласно инструкции изготовителя. Рабочий раствор готовили непосредственно перед постановкой анализа путем разведения Qubit™ dsDNA HS Reagent 1:200 в Qubit™ dsDNA HS Buffer. Определение содержания ДНК набором Equalbit HS (Vazyme, Китай) (далее – Vazyme) и набором Raissol Bio Spectra Q HS (ООО «Сесана», Россия) (далее – Raissol) проводили согласно инструкциям изготовителей.

Мастер-микс для определения ДНК готовили непосредственно перед работой путем разведения для Equalbit HS dye 1:200 Equalbit HS buffer и Spectra Q HS dye 1:200 в Spectra Q HS buffer соответственно. Для наборов Qubit™ dsDNA HS и Equalbit HS производителями заявлен рабочий диапазон концентраций 0.01 до 100 нг/мкл, для Spectra Q HS – диапазон 0.1–100 нг/мкл.

В стандарты и анализируемые образцы добавляли по 190 мкл рабочего раствора соответствующего производителя, мягко перемешивали при помощи вортекса, избегая образования пузырей. Измерение содержания ДНК проводили после инкубации в течение 2 мин в трех независимых репликах, затем полученные значения усредняли. Проверку статистических гипотез выполняли с применением программы IBM® SPSS Statistics v23. Выборки тестировали на нормальность распределения при помощи теста Колмогорова–Смирнова (Алгоритмы биологической статистики,

Таблица 1. Первичные данные о концентрации ДНК (нг/мкл) в плазме крови
Table 1. Primary data on DNA (ng/ μ l) concentration in blood plasma

Номер образца	Invitrogen™ Qubit™ dsDNA HS	Raissol Bio Spectra Q HS	Vazyme Equalbit dsDNA HS
1	0.935	1.190	1.05
2	0.484	0.871	0.599
3	0.507	0.969	0.575
4	0.522	0.796	0.67
5	0.89	1.365	0.889
6	0.459	0.814	0.486
7	0.287	0.62	0.407
8	0.405	0.584	0.505
9	0.406	0.776	0.425
10	0.309	0.819	0.351
11	0.708	1.745	0.8
12	0.366	0.679	0.432
13	0.503	0.979	0.594
14	0.471	0.502	0.536
15	0.324	0.749	0.386
16	0.409	0.594	0.564
17	0.255	0.6725	0.414
18	0.493	0.753	0.66
19	0.416	0.563	0.491
20	0.457	0.592	0.483
21	0.294	0.54	0.427
22	0.31	0.339	0.404
23	0.8	0.829	0.828
24	0.371	0.651	0.422

2018). Поскольку в некоторых выборках распределение отклонялось от нормального и выборки были зависимыми, для оценки различий между исследуемыми наборами применяли критерии непараметрической статистики для зависимых выборок (критерий Уилкоксона с поправками Бонферрони), а также метод линейной регрессии.

Результаты и обсуждение

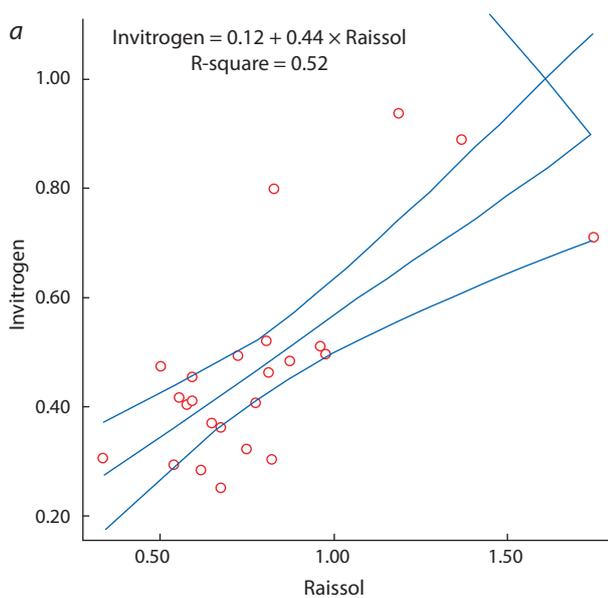
Абсолютные значения концентраций ДНК, измеренных с использованием трех различных наборов, приведены в табл. 1. Базовая статистика для полученных выборок представлена в табл. 2. Показано, что распределение концентраций ДНК, измеренных с помощью наборов Invitrogen™ $p = 0.002$ и Raissol $p = 0.014$, отклонялось от нормального. Попарное сравнение трех зависимых выборок непараметрическими методами (критерий Уилкоксона с поправками Бонферрони) выявило значимые различия между концентрациями ДНК, измеренными с использованием всех

тест-систем (Invitrogen™ и Raissol: $z\text{-score} = -4.286, p < 0.001$; Invitrogen™ и Vazyme: $z\text{-score} = -4.257, p < 0.001$; Raissol и Vazyme: $z\text{-score} = -4.086, p < 0.001$). Сравнение полученных значений с помощью метода линейной регрессии показало значимые зависимости между всеми парами сравнений (Invitrogen™ и Raissol: $R = 0.72, p < 0.001$; Invitrogen™ и Vazyme: $R = 0.97, p < 0.001$; Raissol и Vazyme: $R = 0.7, p < 0.001$) (см. рисунок). Таким образом, результаты определения ДНК наборами Invitrogen™ и Vazyme были сопоставимы между собой, поскольку только в данной паре значение коэффициента детерминации R^2 было выше 0.93.

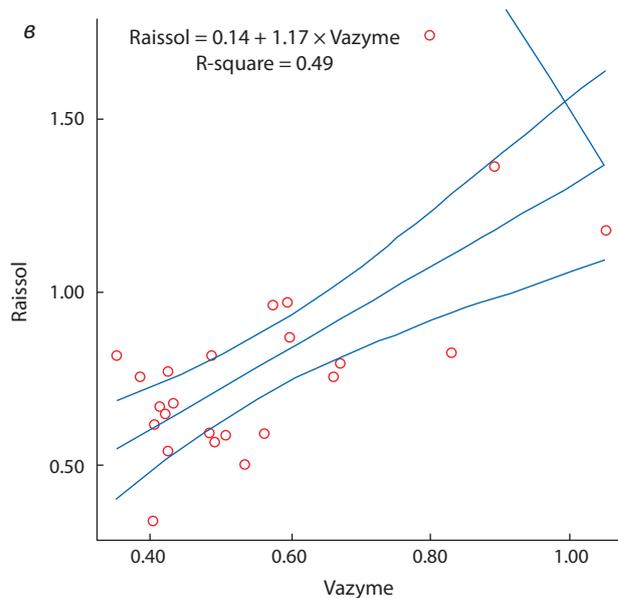
В этом исследовании проведено сравнение трех наборов для определения содержания ДНК в пробе с использованием флуориметра Qubit™. В более ранних исследованиях показано, что точность определения ДНК зависит от используемого для определения красителя (Singer et al., 1997). Часть красителей способна связываться не только с двуцепочечной, но и с одноцепочечной ДНК и РНК.

Таблица 2. Результаты расчетов базовой статистики для всех проведенных измерений концентрации ДНК (нг/мкл)
Table 2. Statistical data for all DNA concentration measurements performed (ng/μl)

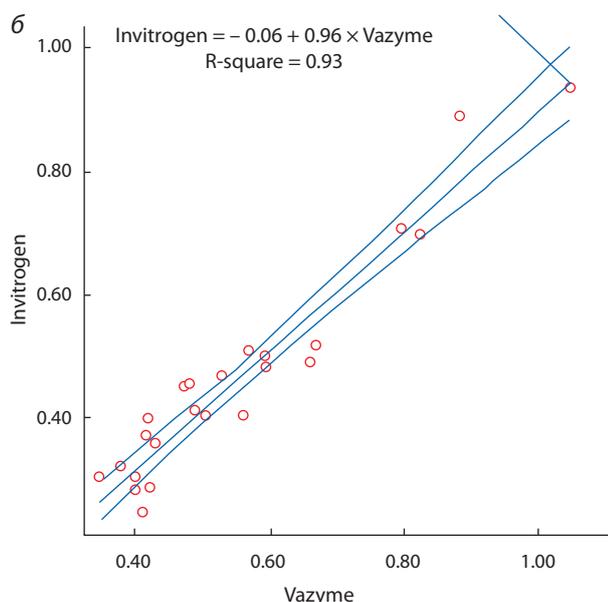
Статистические параметры	Invitrogen™ Qubit™ dsDNA HS	Raissol Bio Spectra Q HS	Vazyme Equalbit dsDNA HS
Медиана	0.437	0.751	0.498
Q1–Q3	0.334–0.506	0.592–0.861	0.427–0.645
Стандартное отклонение	0.185	0.30	0.18
Минимум-максимум	0.26–0.94	0.34–1.75	0.35–1.05



Linear regression with 95.00 % mean prediction interval



Linear regression with 95.00 % mean prediction interval



Linear regression with 95.00 % mean prediction interval

Корреляция между концентрациями ДНК, измеренными с помощью наборов Invitrogen™ Qubit™ dsDNA HS и Raissol Bio Spectra Q HS (а), Invitrogen™ Qubit™ dsDNA HS и Vazyme Equalbit dsDNA HS (б), Raissol Bio Spectra Q HS и Vazyme Equalbit dsDNA HS (в)

Correlation between DNA concentrations, measured by kits Invitrogen™ Qubit™ dsDNA HS and Raissol Bio Spectra Q HS (a), Invitrogen™ Qubit™ dsDNA HS and Vazyme Equalbit dsDNA HS (b), Raissol Bio Spectra Q HS and Vazyme Equalbit dsDNA HS (c)

Нами было показано, что две пары наборов, Invitrogen/Raissol и Vazyme/Raissol, значительно различаются между собой при оценке концентрации нуклеиновых кислот на нижних границах диапазона измерения. Значения, полученные в паре Invitrogen/Vazyme, сопоставимы между собой (см. рисунок). Подобные отличия необходимо учитывать, особенно при разведении ДНК библиотек для секвенирования нового поколения, во избежание низкого количества полученных прочтений. Отметим, что цель нашего исследования не состояла в характеристике наборов для других доступных для них концентраций. Поэтому в иных диапазонах концентраций результаты сравнения могут отличаться от описанных в этой работе.

Заключение

В ходе работы показано, что концентрации ДНК, измеренные с помощью трех наборов, имели статистически значимые различия при парных сравнениях. Значения концентраций ДНК, измеренных с использованием наборов Invitrogen/Vazyme, оказались сопоставимы между собой и могут быть пересчитаны друг относительно друга с применением уравнений регрессии. Кроме того, медианное значение концентрации ДНК, измеренной с помощью набора Raissol Bio Spectra Q HS, было существенно выше, чем значение концентрации, измеренной с использованием наборов Invitrogen™ Qubit™ dsDNA HS и Vazyme Equalbit dsDNA HS.

Список литературы / References

- Алгоритмы биологической статистики: учебн.-метод. пособие / сост. С.П. Кожевников. Ижевск: Изд. центр «Удмуртский университет», 2018
[Algorithms of Biological Statistics: Educational Method: allowance / comp. S.P. Kozhevnikov. Izhevsk: Publ. House Center "Udmurt University", 2018]
- Телышева Е.Н. Свободно-циркулирующая ДНК плазмы крови. Возможности применения в онкологии. *Вестник Российского научно-го центра рентгено радиологии Минздрава России*. 2017; 17(2):2
[Telysheva E.N. Free-circulating DNA of blood plasma. Possible applications in oncology. *Vestnik Rossijskogo Nauchnogo Tsentra Rentgenoradiologii Minzdrava Rossii = Bulletin of the Russian Scientific Center of Radiology of the Ministry of Health of Russia*. 2017;17(2):2. (in Russian)]
- Bonin S., Hlubek F., Benhattar J., Denkert C., Dietel M., Fernandez P.L., Höfler G., Kothmaier H., Kruslin B., Mazzanti C.M., Perren A., Popper H., Scarpa A., Soares P., Stanta G., Groenen P.J. Multicentre validation study of nucleic acids extraction from FFPE tissues. *Virchows Arch*. 2010;457(3):309-317. DOI 10.1007/s00428-010-0917-5
- Glasel J.A. Validity of nucleic acid purities monitored by 260 nm/280 nm absorbance ratios. *BioTechniques*. 1995;18:62-63

- Hoeter K., Neuberger E., Fischer S., Herbst M., Juškevičiūtė E., Enders K., Rossmann H., Sprinzl M.F., Simon P., Bodenstern M., Schaefer M. Evidence for the utility of cfDNA plasma concentrations to predict disease severity in COVID-19: a retrospective pilot study. *PeerJ*. 2023;11:e16072. DOI 10.7717/peerj.16072. PMID: 37744227; PMCID: PMC10512938
- Huberman J.A. Importance of measuring nucleic acid absorbance at 240 nm as well as at 260 and 280 nm. *Biotechniques*. 1995;18:636
- Jones L.J., Yue S.T., Cheung C.Y., Singer V.L. RNA quantitation by fluorescence-based solution assay: RiboGreen reagent characterization. *Anal. Biochem*. 1998;265:368-374. DOI 10.1006/abio.1998.2914
- Kapuscinski J. DAPI: A DNA-specific fluorescent probe. *Biotech. Histochem*. 1995;70(5):220-233. DOI 10.3109/10520299509108199
- Le Pecq J.B., Paoletti C. A new fluorometric method for RNA and DNA determination. *Anal. Biochem*. 1966;17:100-107. DOI 10.1016/0003-2697(66)90012-1
- Manchester K.L. Value of A260/A280 ratios for measurement of purity of nucleic acids. *Biotechniques*. 1995;19:208-210
- Mishra S., Dubey D.B., Agarwal K., Dubey D.B., Verma S., Shabbir N., Kushwaha R., Reddy D.H., Singh U.S., Ali W. Circulating cell-free DNA level in prediction of COVID-19 severity and mortality: correlation of with haematology and serum biochemical parameters. *Indian J. Clin. Biochem*. 2023;38(2):172-181. DOI 10.1007/s12291-022-01082-4. Epub 2022 Aug 21. PMID: 36032561; PMCID: PMC9392861
- Sah S., Chen L., Houghton J., Kemppainen J., Marko A.C., Zeigler R., Latham G.J. Functional DNA quantification guides accurate next-generation sequencing mutation detection in formalin-fixed, paraffin-embedded tumor biopsies. *Genome Med*. 2013;5:77. DOI 10.1186/gm481
- Singer V.L., Jones L.J., Yue S.T., Haugland R.P. Characterization of PicoGreen reagent and development of a fluorescence-based solution assay for double-stranded DNA quantitation. *Anal. Biochem*. 1997;249:228-238. DOI 10.1006/abio.1997.2177
- Turashvili G., Yang W., McKinney S., Kalloger S., Gale N., Ng Y., Chow K., Bell L., Lorette J., Carrier M., Luk M., Aparicio S., Huntsman D., Yip S. Nucleic acid quantity and quality from paraffin blocks: Defining optimal fixation, processing and DNA/RNA extraction techniques. *Exp. Mol. Pathol*. 2012;92:33-43. DOI 10.1016/j.yexmp.2011.09.013

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Спонсоры не участвовали в разработке исследования, при сборе, анализе или интерпретации данных, в написании рукописи или в решении опубликовать результаты.

Поступила в редакцию 11.01.2024. После доработки 11.07.2024. Принята к публикации 15.07.2024.