

УДК 577.29 + 57.018.3

## ОПТИМИЗАЦИЯ ХРАНЕНИЯ ДНК ПРИ БИОБАНКИРОВАНИИ. ИЗУЧЕНИЕ ЦЕЛОСТНОСТИ ОБРАЗЦОВ ДНК ПОСЛЕ МНОЖЕСТВЕННЫХ ЦИКЛОВ ЗАМОРАЖИВАНИЯ

© 2025 г. А. Н. Антоненко<sup>1, \*</sup>, М. В. Олькова<sup>2,</sup> М.С. Беленикин<sup>1, \*\*</sup>

<sup>1</sup>Медико-генетическая лаборатория ООО “Эвоген”, Москва, 119991 Россия

<sup>2</sup>ФГБНУ “Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова”, Москва, 115478 Россия

\*e-mail: antonenko\_a.n@mail.ru

\*\*e-mail: evogenlab@ya.ru

Поступила в редакцию 17.10.2024 г.

После доработки 25.11.2024 г.

Принята к публикации 26.11.2024 г.

Изучено влияние 180 циклов замораживания-размораживания, а также хранения при комнатной температуре в течение 1 года на целостность ДНК, выделенной методом фенол-хлороформной экстракции. Количественная ПЦР в реальном времени с помощью набора для оценки степени фрагментации после 60, 120, 180 циклов, а также после хранения ДНК в течение года при комнатной температуре подтвердила отсутствие фрагментирования ДНК. Используемые в качестве контроля деградации образцы раствора ДНК с экспозициями облучения УФ-светом 15, 30, 45, 60 мин зафиксировали деградацию ДНК, пропорциональную времени облучения, а после 120 мин обработки концентрация ДНК не детектировалась (т.е. составляла менее 30 пг/мкл). Качественная оценка образцов ДНК электрофорезом в агарозном геле не выявила видимых изменений целостности ДНК и признаков её фрагментирования. Полученные результаты продемонстрировали отсутствие детектируемого изменения целостности ДНК после 180 циклов замораживания-размораживания, а также длительного хранения при комнатной температуре.

**Ключевые слова:** фрагментация ДНК, целостность ДНК, биобанк

**DOI:** 10.56304/S0234275825010028

Обеспечение условий максимальной целостности и качества ДНК во время работы, манипулирование образцами при долговременном хранении (биобанкировании) и проведении NGS исследований имеет важное практическое значение и является актуальной задачей [1]. Поскольку в процессе работы образцы ДНК подвергаются многократным циклам замораживания-размораживания (ЦЗР) и продолжительному хранению при разных температурных условиях, необходимо оценивать влияние этих условий на целостность образцов. Литературные данные, касающиеся влияния количества ЦЗР, достаточно разнородны. Согласно одним данным вне зависимости от метода выделения ДНК (авторы тестировали как коммерческие наборы, так и метод фенол-хлороформной экстракции) уже после 18 ЦЗР средний

размер ДНК уменьшался с более чем 300 т.п.н. до, в среднем, 25 т.п.н. [2]. По другим данным целостность выделенной ДНК сохранялась как после 19 ЦЗР [3], так и после 40 ЦЗР [4].

ЦЗР тканей оказывают большое влияние на качество выделенной из них ДНК. Даже один ЦЗР венозной крови человека, изначально хранившейся при  $-70^{\circ}\text{C}$ , снижал целостность ДНК более чем на 25% [4]. Стабильность ДНК, выделенной из опухолевых и нормальных тканей кишки у больных с колоректальным раком, сохранялась после 9 ЦЗР тканей перед выделением [5], а начало деградации РНК из этих же тканей, наблюдалась после 6 ЦЗР [6]. Сохранение целостности ДНК, выделяемой из тканей крыс (печень, мышцы, мозг и семенники), отмечалось при 3 ЦЗР при размораживании тканей при комнатной температуре и 6 ЦЗР при размораживании на льду [7].

На качество образцов ДНК оказывают влияние температурные условия хранения. Хранение при отрицательных температурах ( $-20$  или  $-80^{\circ}\text{C}$ ) в

**Список сокращений:** ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота; РНК – рибонуклеиновая кислота; ЦЗР – цикл заморозки-разморозки; ПЦР – полимеразная цепная реакция; NGS – секвенирование следующего (нового/второго) поколения.

течение 5 лет не оказывало никакого влияния на нарушение целостности образцов геномной ДНК человека, выделенной из цельной крови и растворенной в ТЕ буфере [3].

Эти же авторы показали, что геномная ДНК человека, растворенная в ТЕ, может храниться при  $+4^{\circ}\text{C}$  или даже комнатной температуре без ухудшения качества до 9 и 6 мес., соответственно. Однако при хранении в условиях положительной температуры необходимо контролировать концентрацию ДНК и испарение содержащего ее раствора. Скорость испарения жидкой фазы из закрытых пробирок с образцами, содержащихся при комнатной температуре, составляла 6 мес. Разрабатываются методы хранения ДНК при комнатной температуре в обезвоженном состоянии (основанные на явлении ангидробиоза), без ЦЗР [8], однако отдельные работы сообщают о более быстрой деградации ДНК в безводном состоянии по сравнению с остальными вариантами хранения [3].

На целостность ДНК может влиять метод выделения, так при фенол-хлороформной экстракции не отмечено деградации образцов ДНК в отличие от ДНК, выделенной с использованием магнитных частиц [2, 8].

Важным аспектом, влияющим на качество получаемых образцов ДНК и РНК, является температура и время хранения тканей источников нуклеиновых кислот до обработки. Наиболее качественные образцы РНК получены из крови, содержащейся при комнатной температуре или при  $+4^{\circ}\text{C}$  не более 32 ч. Причем 24 ч – максимальный срок, если образец РНК необходимо использовать для проведения NGS, и до 32 ч – в случае проведения последующего анализа на микрочипах. Следует отметить, что хранение крови при  $-80^{\circ}\text{C}$  не предотвращает деградацию и повреждение РНК. Целостность выделяемой ДНК из крови с добавлением гепарина, хранившейся при комнатной температуре до 15 дней, практически не менялась [9].

Таким образом, литературные данные свидетельствуют о первостепенном влиянии на целостность ДНК преаналитического этапа, качества биоматериала, а также метода выделения ДНК. Для получения препаратов ДНК с минимальными признаками деградации размораживание образцов крови и ткани должно быть сведено к минимуму, что может быть достигнуто путем аликвотирования биоматериала перед замораживанием. Либо для дальнейшего хранения необходимо извлечь ДНК из крови и тканей, поскольку выделенная ДНК более стабильна. Однако, точные

количественные оценки числа ЦЗР, приводящих к четко фиксируемой деградации и фрагментированию образцов ДНК не установлены, и вопрос о количестве циклов замораживания-размораживания, достаточных для четкой дифференциации исходного и фрагментированного образцов ДНК остается открытым. Кроме того, до конца не решен вопрос о возможности длительного хранения образцов ДНК при комнатной температуре.

В данном исследовании представлены результаты изучения влияния 180 ЦЗР а также продолжительного (12 мес) хранения при комнатной температуре образцов ДНК на степень ее фрагментированности.

Для проведения эксперимента были отобраны 3 образца ДНК, выделенные из цельной крови (кровь была собрана в пробирки с ЭДТА) фенол-хлороформной экстракцией [10] с последующей элюцией в ТЕ. Независимо от модификации метода при выделении из цельной крови данный протокол обычно позволяет получить фрагменты ДНК в диапазоне  $\approx 15\text{--}30$  т.п.н. Концентрация ДНК была в диапазоне  $35\text{--}60$  нг/мкл (измерение проводили при помощи флуориметрического метода), чистота ДНК соответствовала критериям чистой ДНК ( $\text{OD}_{260/280} \approx 1,8$ ;  $\text{OD}_{230/260} \approx 2$ ).

Одну часть каждого образца подвергали ЦЗР: замораживали при  $-35^{\circ}\text{C}$  и размораживали при комнатной температуре, другую – выдерживали при комнатной температуре 12 мес. Для анализа через 60, 120, 180 ЦЗР отбирали аликвоты. Анализ образцов, которые в течение 12 мес. хранились при комнатной температуре, проводили по истечении срока хранения. Количество в 180 циклов было выбрано исходя из того, что такое число ЦЗР возможно достичь при работе с криовиалами объемом  $1500\text{--}2000$  мкл и хранимом объеме ДНК 500 мкл, при манипулировании 3 мкл образца ДНК за  $1 \times$  ЦЗР. Аликвоты стоковых растворов ДНК, сразу после выделения и однократного замораживания использовали в качестве контроля для всех образцов. Для контроля степени фрагментации аликвоты стокового образца подвергались воздействию УФ-света с экспозицией 15, 30, 45, 60 и 120 мин.

Так как при множественных ЦЗР и аликвотировании происходит неизбежное испарение жидкой фазы и, соответственно, повышение концентрации, то перед постановкой ПЦР, все аликвоты были разбавлены в 10 раз. Оценку целостности ДНК проводили качественно с помощью элек-

трофореза в агарозном геле, при следующих параметрах: 0.5%-ный агарозный гель на 1× TAE буфере, напряжение 7 В/см, 35 мин. Окрашивание при помощи бромистого этидия (“Биолабмикс”, Россия). Дополнительно исследовали образцы на капиллярном электрофорезе (Qsep100; “BiOptic”, Тайвань) с использованием картриджа высокого разрешения (S1 High Resolution; “BiOptic”). Для количественного анализа использовали метод кПЦР на амплификаторе DTprime-5M1 (“ДНК-Технология”, Россия) с помощью набора для количественной и качественной оценки геномной ДНК человека QuantumDNA-Set (“Евроген”, Россия). Степень фрагментации цельной ДНК оценивали путем измерения соотношения концентрации фрагментов разных длин, результаты экспериментов приведены в табл. 1. Измерения для каждого образца проводили в трех технических повторях и в двух дублях на каждую постановку ПЦР.

Согласно полученным результатам, представленным в таблице, в соответствии с критериями оценки целостности все образцы, подвергавшиеся ЦЗР, а также находившиеся при комнатной температуре, не являются фрагментированными (индекс деградации менее 1.5). То есть при увеличении количества ЦЗР не происходит рост числа фракций коротких фрагментов, относительно контролей, в отличие от образцов с УФ экспозицией. Значения индексов деградации, полученные между повторностями и дублями образцов, статистически достоверно не отличались друг от друга и были усреднены.

Качественная оценка исходных и тестируемых образцов с помощью электрофореза в агарозном геле так же не выявила никаких видимых изменений (отсутствовали какие-либо признаки фрагментации ДНК). В контрольных образцах, подвергнутых воздействию УФ-облучения, индекс деградации увеличивался пропорционально времени экспозиции, а после 120 мин обработки концентрация ДНК не детектировалась (т.е. составляла менее 30 пг/мкл). При исследовании образцов при помощи капиллярного электрофореза деградация ДНК также выявлена не была.

По итогам полученных результатов можно сделать вывод об отсутствии фиксируемых изменений, свидетельствующих о фрагментации или деградации ДНК в ходе более чем 180 ЦЗР образцов ДНК, а также после длительного (год) хранения при комнатной температуре, что согласуется с результатами, представленными другими коллективами [3, 4]. Причем по нашим данным со-

**Таблица 1.** Влияние изучаемых факторов на деградацию ДНК

**Table 1.** Influence of the research factors on DNA degradation

Образцы	Индексы деградации		
	91/156*	91/211**	156/211***
1-3 (контроль)	0.76	0.67	0.88
1-3 (60 циклов)	0.76	0.70	0.92
1-3 (120 циклов)	0.73	0.65	0.93
1-3 (180 циклов)	0.70	0.64	0.91
1-3 (комн. темп.)	0.78	0.79	1.01
1 (УФ 15 мин)	2.67	8.62	3.23
1 (УФ 30 мин)	4.06	17.07	4.20
1 (УФ 45 мин)	6.36	43.14	6.79
1 (УФ 60 мин)	6.13	55.17	9.00
1 (УФ 120 мин)	0.00	0.00	0.00

Примечание. \* 91/156 – ДНК не фрагментирована (<1.5); Слабо/умеренно фрагментирована (1.5–3); Сильно фрагментирована (>3);

\*\* 91/211 – ДНК не фрагментирована (<1.5); Слабо/умеренно фрагментирована (1.5–9); Сильно фрагментирована (>9);

\*\*\* 156/211 – ДНК не фрагментирована (<1.5); Слабо/умеренно фрагментирована (1.5–3); Сильно фрагментирована (>3).

Note. \* 91/156 – DNA not fragmented (<1.5); Weakly/moderately fragmented (1.5–3); Highly fragmented (>3);

\*\* 91/211 – DNA not fragmented (<1.5); Weakly/moderately fragmented (1.5–9); Highly fragmented (>9);

\*\*\* 156/211 – DNA not fragmented (<1.5); Mildly/moderately fragmented (1.5–3); Highly fragmented (>3).

держание при комнатной температуре вероятно можно пролонгировать с 6 [3] до 12 мес. Такая разница в сроках хранения в связана с рядом факторов, например, с концентрацией образцов ДНК, поскольку при более высокой ее концентрации они стабильнее при положительных температурах [2]. Поэтому, на наш взгляд, данный аспект требует отдельного внимания.

Поскольку 180 ЦЗР не привели к фрагментации образцов ДНК, хранить ДНК можно в одной криовiale большого объема, без деления на аликвоты не опасаясь влияния множественных ЦЗР на качество ДНК при дальнейших NGS исследованиях. Хранение в низкотемпературном морозильнике или автоматической станции для биобанкирования (от –40 до –80°C) выглядит наиболее предпочтительным, т. к. использование для этой цели жидкого азота может приводить к образованию сгустков ДНК при ЦЗР [11].

Поскольку процесс замораживания-размораживания сопряжен с изменением фазового состояния, то каждый ЦЗР может потенциально влиять на структурную целостность молекулы ДНК. Согласно литературным данным, целостность ДНК соотносится со временем, необходимым для разрыва отдельных молекул ДНК при воздействии силы в 5–35 пН, имитирующей механические взаимодействия между ДНК и другими биомолекулами. При воздействии силы в 5 пН среднее время жизни молекулы ДНК до разрыва составили 44 и 133 мин для образцов, подвергавшихся замораживанию и не подвергавшихся, соответственно; при воздействии силы в 15 пН среднее время жизни составляло, соответственно 10.8 и 78.5 мин [12]. Нами было показано, что после 180 ЦЗР ДНК остается стабильной и без признаков деградации, что позволяет делать предположения о сохранении целостности ДНК при большем числе ЦЗР; поэтому практический интерес будут представлять работы, в которых число циклов может быть увеличено.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность лаборатории Геномной географии ИОГен РАН им. Н.И.Вавилова, научные дискуссии с сотрудниками которой в 2018 г позволили инициировать данные исследования с целью демонстрации описанного выше варианта хранения ДНК при организации биобанка для целей дальнейшего полногеномного секвенирования.

#### ЭТИЧЕСКИЕ НОРМЫ

Все работы с биоматериалом, выполненные в данной работе, соответствуют этическим нормам и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Биобанкирование*. Национальное руководство. Под ред. Мешкова А.Н., Глотова А.С., Анисимова С.В., М.: Изд-во Триумф, 2022, 308.
2. *Shao W., Khin S., Kopp W.C.* Characterization of effect of repeated freeze and thaw cycles on stability of genomic DNA using pulsed field gel electrophoresis. *Bio-preserv. Biobank.*, 2012, 10(1), 4–11. <https://doi.org/10.1089/bio.2011.0016>
3. *Wu J., Cunanan J., Kim L., Kulatunga T., Huang C., Anekella B.* Stability of Genomic DNA at Various Storage Conditions. *International Society for Biological and Environmental Repositories*. 2009. Annual Meeting May Poster QAC 03.
4. *Ross K.S., Haites N.E., Kelly K.F.* Repeated freezing and thawing of peripheral blood and DNA in suspension: effects on DNA yield and integrity. *J. Med. Genet.*, 1990, 27, 569–570. <https://doi.org/10.1136/jmg.27.9.569>
5. *Xin-Juan F., Yan H., Pei-Huang W., Xin-Ke Y., Xi-Hu Y., Xin-Hui F., Li-Li F., Yun-Long W., Hong-Jun Y., Zhi-Ting C., Jun-Xiang Y., Da-Lu Z., Wei-Xing F., Shao-Mei B., Taewan K., Gordon B M., Yi-Ling L., Xiang-Bo W., Lei W.* Impact of Cold Ischemic Time and Freeze-Thaw Cycles on RNA, DNA and Protein Quality in Colorectal Cancer Tissues Biobanking. *J. Cancer*, 2019, 20, 4978–4988. <https://doi.org/10.7150/jca.29372>
6. *Shabihkhani M., Lucey G.M., Wei B., Mareninov S., Lou J.J., Vinters H.V., Singer E.J., Cloughesy T.F., Yong C.H.* The procurement, storage, and quality assurance of frozen blood and tissue biospecimens in pathology, biorepository, and biobank settings. *Clin. Biochem.*, 2014, 47, 258–266. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2014.01.002>
7. *Ji X., Wang M., Li L., Chen F., Zhang Y., Li Q., Zhou J.* The Impact of Repeated Freeze-Thaw Cycles on the Quality of Biomolecules in Four Different Tissues. *Bio-preserv. Biobank.*, 2017, 15(5), 475–483. <https://doi.org/10.1089/bio.2017.0064>
8. *Frippiat C., Zorbo S., Leonard D., Mfrcotte A., Chaput M., Aelbrecht C., Noel F.* Evaluation of novel forensic DNA storage methodologies. *Forens. Sci. Int. Genet.*, 2011, 5(5), 386–392. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2010.08.007>
9. *Huang L.H., Lin P.H., Tsai K.W., Wang L.J., Huang Y.H., Kuo H.C., Li S.C.* The effects of storage temperature and duration of blood samples on DNA and RNA qualities. *PLoS One*, 2017, 12(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184692>
10. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование – пер. с англ. М.: Изд-во Мир, 1984, 480.
11. *Safarikova M., Kubena A., Frankova V., Zima T., Kalousova M.* The Effects of Different Storage Conditions and Repeated Freeze/Thaw Cycles on the Concentration, Purity and Integrity of Genomic DNA. *Folia Biol (Praha)* 2021, 67(1), 10–15.
12. *Chung W.J., Cui Y., Chen C.S., Wei H.W., Chang S.R., Shu Y.W., Hsu C.I.* Freezing shortens the lifetime of DNA molecules under tension. *J. Biol. Phys.*, 2017, 43(4), 511–524. <https://doi.org/10.1007/s10867-017-9466-3>

## Optimisation of DNA Storage During Biobanking. Research of DNA Samples Integrity after Multiple Freezing Cycles

A. N. Antonenko<sup>a, #</sup>, M. V. Olkova<sup>b</sup>, and M. S. Belenikin<sup>a, ##</sup>

<sup>a</sup>Medical and genetic laboratory Evogen LLC, Moscow, 119991 Russia

<sup>b</sup>Research Centre for Medical Genetics named after Academician N.P. Bochkov, Moscow, 115478 Russia

<sup>#</sup>e-mail: antonenko\_a.n@mail.ru

<sup>##</sup>e-mail: evogenlab@ya.ru

**Abstract**—The effect of 180 freeze-thaw cycles and storage at room temperature for 1 year on the integrity of DNA isolated by phenol-chloroform extraction was studied. Quantitative real-time PCR using a fragmentation assessment kit after 60, 120, 180 cycles as well as after DNA storage for one year at room temperature confirmed the absence of DNA fragmentation. DNA solution samples used as degradation controls with UV light irradiation exposures of 15, 30, 45, 60 min recorded DNA degradation proportional to the irradiation time, and after 120 minutes of treatment the DNA concentration was undetectable (i.e., less than 30 pg/ $\mu$ L). Qualitative assessment of DNA sample integrity by agarose gel electrophoresis revealed no visible changes in DNA integrity and no evidence of DNA fragmentation. The results demonstrated no detectable change in DNA integrity after 180 freeze-thaw cycles and long-term storage at room temperature.

**Keywords:** DNA fragmentation, DNA integrity, biobank

Свидетельство о регистрации средства массовой информации  
ПИ № ФС77-75946 от 13 июня 2019 г., выдано Федеральной службой по надзору в сфере связи,  
информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор)

---

Подписано к печати 15.01.2025 г. Дата выхода в свет 13.02.2025 г. Формат 60 × 88<sup>1</sup>/<sub>8</sub> Усл. печ. л. 14.76 Уч.-изд. л. 15.0  
Тираж 27 экз. Зак. 7912 Цена договорная

---

Учредители: Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»

---

Издатель: НИЦ «Курчатовский институт», 123182, Россия, г. Москва, пл. Академика Курчатова, д. 1  
Исполнитель по контракту № 35-3-24-44-5 от 22.04.2024 г. ООО «Объединённая редакция»,

109028, г. Москва, Подкопаевский пер., д. 5, каб. 6

Отпечатано в типографии «Book Jet» (ИП Коняхин А.В.),  
390005, г. Рязань, ул. Пушкина, 18, тел. (4912) 466-151

16+