

Анализ выхода ДНК при ее автоматизированной экстракции из лейкоцитов крови

Олькова М.В.¹, Балановская Е.В.¹, Бычковская Л.С.¹, Балановский О.П.^{1,2,3}

1 — ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова»
115522, г. Москва, ул. Москворечье, д.1

2 — ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук
119991, г. Москва, ул. Губкина, 3

3 — Биобанк Северной Евразии
115201, г. Москва, ул. Котляковская, д. 3, стр. 12, офис 4

Все более широкое применение поточных методов экстракции ДНК влечет за собой необходимость стандартизации и проверки качества ее выделения. Мы провели детальное количественное изучение процесса выделения и определили стандартизирующие опорные точки для одного из наиболее производительных методов – выделения на магнитных частицах с использованием автоматической станции QIASymphony SP. Показано, что концентрация ДНК в индивидуальном образце в основном определяется содержанием лейкоцитов в исходном образце крови (корреляция около 0,9). Концентрация ДНК также зависит от метода измерения. Это позволило нам построить линейные регрессионные модели и вывести формулы, точно прогнозирующие концентрацию ДНК в образце для случаев применения двух широко распространенных методов – спектрофотометрического (Nanodrop) и флуоресцентного (Qubit). Обнаружено, что последняя модель Nanodrop OneC, благодаря встроенному алгоритму идентификации примесей и корректировки концентрации, дает более точную оценку концентрации, чем Qubit 4.0. Для быстрого, но приблизительного прогноза концентрации ДНК вместо регрессионных моделей могут применяться стандарты, рассчитанные нами для референсных значений содержания лейкоцитов.

Ключевые слова: выделение ДНК, масса генома человека, масса ДНК, референсные значения, лейкоциты, магнитные частицы, концентрация ДНК, спектрофотометрический метод, флуоресцентный метод, QIASymphony SP.

Для цитирования: Олькова М.В., Балановская Е.В., Бычковская Л.С., Балановский О.П. Анализ выхода ДНК при ее автоматизированной экстракции из лейкоцитов крови. *Медицинская генетика* 2020; 19(10): 40-50.

DOI: 10.25557/2073-7998.2020.10.40-50

Автор для переписки: Олькова М.В.; e-mail: m.olkova@med-gen.ru

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России для ФГБНУ «МГНЦ».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 15.09.2020.

Analysis of automatically extracted white blood cell DNA yield

Olkova M.V.^{1,2}, Balanovska E.V.², Bychkovskaya L.S.², Balanovsky O.P.^{1,2,3}

1 — Research Centre for Medical Genetics
Moskvorechie str., 1, Moscow, 115522, Russia

2 — Vavilov Institute of General Genetics Russian Academy of Science
Gubkina str. 3, Moscow, 119991, Russia

3 — Biobank of Northern Eurasia
Kotlyakovskaya str. 3, bld.12, of.4, Moscow, 115201, Russia

The continuing development of mass DNA extraction methods entails the need to set standardisation and quality verification reference points. A study has been conducted and standards set for one of the many methods of DNA extraction – the automated magnetic beads-based extraction using QIASymphony SP station. It was shown that the concentration of DNA in an individual sample is mainly determined by the leukocyte content in the initial blood sample (correlation of about 0.9). DNA concentration also depends on the measurement method. It allowed us to build linear regression models and derive formulae that accurately predict the concentration of DNA in the sample for the use of two widely used methods – spectrophotometric (Nanodrop) and fluorescence (Qubit). It was found that the latest Nanodrop OneC model, thanks to a built-in algorithm for identifying impurities and adjusting the concentration, provides an even more accurate concentration estimate than Qubit 4.0. For a quick but rough forecast of DNA concentration, instead of regression models, standards calculated by us for reference values of the white blood cell count can be used.

Keywords: DNA extraction, human genom mass, DNA mass, reference values, leukocytes, magnetic beads, DNA concentration, spectrophotometric method, fluorescence method, QIASymphony SP.

For citation: Olkova M.V., Balanovska E.V., Bychkovskaya L.S., Balanovsky O.P. Analysis of automatically extracted white blood cell DNA yield. *Medical genetics*. 2020; 19(10): 40-50. (In Rus.).

DOI: 10.25557/2073-7998.2020.10.40-50

Corresponding author: *Olkova M.V.*; e-mail: m.olkova@med-gen.ru

Funding. The work was supported by state assignment of the Ministry of Science and Higher Education of Russia for the Research Centre for Medical Genetics.

Conflict of Interest. Authors declare no conflict of interest.

Accepted: 15.09.2020.

В последние десятилетия в связи с экспоненциальным ростом объемов полногеномного и полноэкзомного секвенирования, а также ввиду быстрого развития биобанкирования, призванного компенсировать растущий дефицит образцов для работ в области персонализированной медицины, резко вырос спрос на высококачественные образцы с точными, надежными и стандартизированными лабораторными характеристиками [1–4].

Для обеспечения таких лабораторных требований необходима стандартизация подготовки образцов. В частности, выделение ДНК из образцов крови и оценка количества выделенной ДНК являются едва ли не наиболее широко используемыми методами.

Литература по количественным характеристикам различных методик выделения ДНК обширна, но в подавляющем большинстве статей упоминается только средняя концентрация ДНК, получаемая при выделении из образца крови [5–7]. Иногда приводится медиана [8], минимальная и максимальная концентрации [9], но этого недостаточно, чтобы описать распределение значений, с которым столкнется исследователь при использовании данного метода. Более того, поскольку выделение ДНК происходит из лейкоцитов, а их содержание в крови широко варьирует у различных людей, то количественный выход ДНК будет меняться. Также мало исследован вопрос о максимальном возможном выходе ДНК и, соответственно, каковы потери ДНК при выделении различными методами.

Качественная очистка, высокий выход ДНК, отсутствие контаминации и возможность автоматизации являются необходимыми требованиями к методам экстракции ДНК, используемым в области геномики и персонализированной медицины. Из многих методов выделения ДНК [7, 10, 11], далеко не все удовлетворяют этим требованиям. Например, один из самых распространенных жидкофазных методов – фенол-хлороформная экстракция – отличается высоким выходом ДНК, но использование токсичных реагентов, невозможность полной автоматизации и частое наличие примесей, ингибирующих ферменты, делают этот метод не оптимальным для современных крупных лабораторий. Твердофаз-

ные методы, напротив, проще автоматизировать, что очень важно для стандартизации и воспроизводимости результатов. В частности, магнитная экстракция является простым, легко автоматизируемым, высокоэффективным методом с высокой чистотой получаемой ДНК [12, 13], в том числе при реализации этого метода в роботизированной станции QIASymphony SP [13, 14]. Станция позволяет выполнять до четырех различных протоколов экстракции ДНК в цикле из 96 образцов в течение 8-часового рабочего дня [14]. Насколько нам известно, это максимальное значение среди всех вариантов выделения ДНК, представленных на российском рынке. Эта станция уже используется в ряде крупнейших европейских [15–20] и российских геномных проектов (включая проекты «Российские геномы» [21] и «ДНК-идентификация»), и можно ожидать дальнейшего роста ее популярности для проектов, требующих массового и быстрого выделения ДНК. Для широкого использования этой системы крупным биомедицинским лабораториям и биобанкам важно стандартизировать данный метод, прогнозировать объемы выделяемой ДНК и вовремя оценивать качество работы персонала и оборудования, поэтому выведение соответствующих формул прогнозируемого выхода стало одной из задач нашей работы.

Общей целью исследования было дать подробное, количественное описание результативности метода выделения ДНК на магнитных частицах (в его реализации на автоматической станции QIASymphony SP). Поэтому работа включала, во-первых, анализ корреляции между содержанием лейкоцитов в крови пациентов и массой выделенной ДНК, во-вторых, сравнение концентраций, полученных при измерении разными методами, в-третьих, испытание недавно выпущенной на рынок модели Nanodrop OneC, в-четвертых, оценку максимально возможной массы ДНК, и в-пятых, оценку ее реального выхода, то есть уровня потерь ДНК при выделении. Дополнительной задачей стало выведение формул, позволяющих прогнозировать среднюю концентрацию ДНК и разброс значений, что имеет практическое значение при внедрении методов выделения ДНК и контроля качества.

Методы

Экспериментальные методы

Материалом исследования послужили 44 образца венозной крови в пробирках с антикоагулянтом ЭДТА. Все образцы хранились при +4°C не более 14 дней от момента взятия их у донора. От всех доноров получено информированное добровольное согласие.

Во всех образцах крови был проведен подсчет количества лейкоцитов с использованием автоматического гематологического анализатора Micros ES 60 производства компании Horiba ABX.

ДНК была выделена с использованием автоматизированной станции QIASymphony SP для выделения нуклеиновых кислот и белков производства компании QIAGEN на наборе QIASymphony DNA Midi Kit (96). Для экстракции ДНК был выбран протокол выделения из крови объемом 400 мкл с конечным растворением ДНК в 200 мкл элюата. Элюат – ТАЕ-буфер производителя, где Т – Трис-НСl, Е – ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота), а А – консервант, используемый производителем.

Для измерения концентрации ДНК в образцах использовались два прибора с принципиально разным способом измерения:

Флуориметр Qubit 4.0 производства Thermo Fisher Scientific. Измерение проводилось по инструкции производителя на базе набора Qubit dsDNA BR Assay Kit. Для измерения концентрации ДНК было взято по 2 мкл образца.

Спектрофотометр NanoDrop OneC производства Thermo Fisher Scientific. Измерение производилось в 2 мкл раствора ДНК, базовый спектр был измерен на ТАЕ-буфере для элюции ДНК из набора QIASymphony DNA Midi Kit (96) производства компании QIAGEN. Измерение производилось согласно инструкции производителя.

Статистическая обработка данных

Все расчеты были произведены с использованием RStudio R версия 3.6.3 (Vienna, Austria, <http://www.R-project.org>) [22] и Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA).

Был выполнен одномерный регрессионный анализ, построены графики и рассчитаны коэффициенты корреляции Пирсона для двух моделей взаимосвязи двух количественных переменных:

1) числа лейкоцитов в крови и концентрации ДНК при измерении концентрации на Qubit 4.0,

2) числа лейкоцитов в крови и концентрации ДНК при измерении концентрации с использованием NanoDrop OneC.

При расчетах значение $p \leq 0,05$ считалось статистически значимым.

Расчет массы генома

Для вычисления максимально возможного выхода ДНК, т.е. общей массы ДНК, содержащейся в заданном объеме крови, требуется знать число лейкоцитов и массу ДНК в одном лейкоците, т.е. массу генома человека. Существующие оценки массы генома [23, 24] разнятся на несколько процентов, что может быть существенным для оценки потерь ДНК, которая также может составлять несколько процентов. Поэтому мы провели расчет массы генома человека, исходя из данных последней сборки генома GRCh38.p13 [25]. Вкратце, длина каждой хромосомы была умножена на вес GC и AT нуклеотидных пар, с учетом неодинакового GC-состава разных хромосом (табл. 1), и к полученному весу ядерного генома был добавлен рассчитанный вес митохондриального генома, соответственно его копийности в лейкоцитах. Молекулярный вес нуклеотидных пар AT и GC получен из работы [23], где был рассчитан с учетом атомной единицы массы с сайта Национального института стандартов и технологий США [26], а процентное содержание AT и GC пар было взято из базы данных NCBI [27].

Данные по количеству копий митохондриальной ДНК на лейкоцит получены из [28]. В связи с малым размером мтДНК и ее внеядерной локализацией ее потери при выделении геномной ДНК могут быть значительными и особенно зависящими от метода выделения. В частности, при методе высаливания потери минимальны, и если условно принять их за нулевые, то при выделении смолой Chelex потери составят 43%, а при использованном в нашей работе выделении на магнитных частицах потери достигают 86% [28]. Поэтому для расчета массы генома лейкоцита мы воспользовались результатами применения метода высаливания – 283 ± 164.6 копий мтДНК на лейкоцит, что соответствует массе митохондриального генома 4,8 фг (табл. 2).

В результате расчетов полученная масса мужского генома составила 6,47 пг, масса женского генома на 2% больше (за счет большей длины X-хромосомы), поэтому для дальнейших расчетов мы использовали среднюю массу генома 6,52 пг.

Результаты

Расчет диапазона концентраций ДНК и ее массы.

Мы измерили содержание лейкоцитов в 44 образцах крови и провели выделение ДНК на магнитных частицах с использованием автоматической станции

Таблица 1

Характеристики образцов крови и ДНК

№ образца	Концентрация ДНК на Qubit (нг/мкл)	Концентрация ДНК на NanoDrop (нг/мкл)	Число лейкоцитов в образце (тыс/мкл)	Масса ДНК на лейкоцит по Qubit (нг)	Масса ДНК на лейкоцит по NanoDrop (нг)	Идеальная концентрация ДНК (нг/мкл)	Ratio % для Qubit 4.0	Ratio % для NanoDrop OneC
1	33,8	34,12	3,50	4,83	4,87	45,70	73,96	74,65
2	70,4	59,34	5,80	6,07	5,12	75,74	92,95	78,35
3	57,9	56,37	5,80	4,99	4,86	75,74	76,45	74,43
4	64,0	66,94	6,30	5,08	5,31	82,27	77,80	81,37
5	63,0	71,52	6,60	4,77	5,42	86,18	73,10	82,99
6	42,6	56,76	5,00	4,26	5,68	65,29	65,25	86,93
7	74,3	84,64	7,70	4,82	5,50	100,55	73,90	84,18
8	43,8	55,00	6,80	3,22	4,04	88,79	49,33	61,94
9	89,1	97,82	9,60	4,64	5,09	125,36	71,08	78,03
10	41,4	72,53	6,40	3,23	5,67	83,57	49,54	86,78
11	64,9	76,20	7,40	4,39	5,15	96,63	67,16	78,85
12	42,3	56,54	5,60	3,78	5,05	73,12	57,85	77,32
13	92,4	86,03	8,60	5,37	5,00	112,30	82,28	76,61
14	68,4	85,65	8,50	4,02	5,04	110,99	61,63	77,17
15	32,5	31,12	3,50	4,64	4,45	45,70	71,11	68,08
16	62,3	67,18	7,10	4,39	4,73	92,71	67,20	72,47
17	111,4	115,89	12,30	4,53	4,71	160,61	69,36	72,15
18	39,1	43,91	4,50	4,34	4,88	58,76	66,54	74,72
19	57,3	60,08	6,30	4,55	4,77	82,27	69,65	73,03
20	62,0	60,92	6,70	4,63	4,55	87,49	70,87	69,64
21	60,0	68,96	7,10	4,23	4,86	92,71	64,72	74,39
22	68,0	56,67	6,10	5,57	4,64	79,65	85,37	71,14
23	72,1	86,13	10,70	3,37	4,02	139,72	51,60	61,64
24	68,4	73,23	7,80	4,38	4,69	101,85	67,16	71,90
25	63,8	60,74	7,10	4,49	4,28	92,71	68,82	65,51
26	81,6	65,65	7,20	5,67	4,56	94,02	86,79	69,83
27	51,5	55,32	5,70	4,52	4,85	74,43	69,19	74,32
28	71,5	66,25	5,30	6,75	6,25	69,21	103,31	95,72
29	42,6	57,75	5,30	4,02	5,45	69,21	61,55	83,45
30	40,4	50,19	4,90	4,12	5,12	63,98	63,14	78,45
31	68,5	75,78	7,70	4,45	4,92	100,55	68,13	75,36
32	59,0	65,93	6,80	4,34	4,85	88,79	66,45	74,25
33	60,1	55,00	6,10	4,93	4,51	79,65	75,45	69,05
34	23,9	46,86	3,40	3,51	6,89	44,40	53,83	105,56
35	101,4	115,82	12,50	4,06	4,63	163,23	62,12	70,96
36	76,8	94,62	9,10	4,22	5,20	118,83	64,63	79,63
37	69,0	74,26	7,50	4,60	4,95	97,94	70,45	75,83
38	52,0	73,04	7,80	3,33	4,68	101,85	51,05	71,71
39	73,0	78,47	8,00	4,56	4,90	104,46	69,88	75,12
40	60,3	75,91	8,40	3,59	4,52	109,69	54,97	69,20
41	54,3	52,69	6,00	4,53	4,39	78,35	69,31	67,25
42	69,8	90,59	9,70	3,60	4,67	126,66	55,11	71,52
43	45,3	42,14	5,00	4,53	4,21	65,29	69,38	64,54
44	39,6	42,49	5,10	3,88	4,17	66,60	59,46	63,81
Медиана	62,15	66,09	6,75	4,47	4,86	88,14	68,47	74,41
Среднее	61,04	67,34	6,92	4,45	4,91	90,31	68,16	75,22
p-значение	0,270	0,247	0,068	0,030	0,003	0,068	0,030	0,003

Примечание: приведены концентрации ДНК (нг/мкл), измеренные на Qubit 4.0 и NanoDrop OneC, количество лейкоцитов в образцах и рассчитанные – масса ДНК на лейкоцит, идеальная концентрация ДНК (концентрация без учета потерь при выделении) и процент выделенной ДНК (Ratio %). В заключительных строках приведены медиана, среднее по каждой переменной и P-значение теста Шапиро-Уилка для оценки нормальности их распределения.

Расчет массы ДНК в лейкоците человека

Хромосома	Длина (п.н.)	GC%	AT%	GC (п.н.)	AT (п.н.)	Масса GC (г)	Масса AT (г)	Общая масса (г)
1	248956422	42.30	57.70	1.053086*10 ⁸	1.436479*10 ⁸	1.077842*10 ⁻¹³	1.467891*10 ⁻¹³	2.545733*10 ⁻¹³
2	242193529	40.30	59.70	9.760399*10 ⁷	1.445895*10 ⁸	9.989847*10 ⁻¹⁴	1.477514*10 ⁻¹³	2.476499*10 ⁻¹³
3	198295559	39.70	60.30	7.872334*10 ⁷	1.195722*10 ⁸	8.057397*10 ⁻¹⁴	1.221870*10 ⁻¹³	2.027610*10 ⁻¹³
4	190214555	38.30	61.70	7.285217*10 ⁷	1.173624*10 ⁸	7.456478*10 ⁻¹⁴	1.199289*10 ⁻¹³	1.944936*10 ⁻¹³
5	181538259	39.50	60.50	7.170761*10 ⁷	1.098306*10 ⁸	7.339331*10 ⁻¹⁴	1.122324*10 ⁻¹³	1.856257*10 ⁻¹³
6	170805979	39.60	60.40	6.763917*10 ⁷	1.031668*10 ⁸	6.922923*10 ⁻¹⁴	1.054229*10 ⁻¹³	1.746521*10 ⁻¹³
7	159345973	40.70	59.30	6.485381*10 ⁷	9.449216**10 ⁷	6.637839**10 ⁻¹⁴	9.655852*10 ⁻¹⁴	1.629369*10 ⁻¹³
8	145138636	40.20	59.80	5.834573*10 ⁷	8.679290*10 ⁷	5.971732**10 ⁻¹⁴	8.869089*10 ⁻¹⁴	1.484082*10 ⁻¹³
9	138394717	42.30	57.70	5.854097*10 ⁷	7.985375*10 ⁷	5.991715*10 ⁻¹⁴	8.159999*10 ⁻¹⁴	1.415171*10 ⁻¹³
10	133797422	41.60	58.40	5.565973*10 ⁷	7.813769*10 ⁷	5.696818*10 ⁻¹⁴	7.984641*10 ⁻¹⁴	1.368146*10 ⁻¹³
11	135086622	41.60	58.40	5.619603*10 ⁷	7.889059*10 ⁷	5.751709*10 ⁻¹⁴	8.061577*10 ⁻¹⁴	1.381329*10 ⁻¹³
12	133275309	40.80	59.20	5.437633*10 ⁷	7.889898*10 ⁷	5.565460*10 ⁻¹⁴	8.062435*10 ⁻¹⁴	1.362790*10 ⁻¹³
13	114364328	40.20	59.80	4.597446*10 ⁷	6.838987*10 ⁷	4.705523*10 ⁻¹⁴	6.988542*10 ⁻¹⁴	1.169406*10 ⁻¹³
14	107043718	42.20	57.80	4.517245*10 ⁷	6.187127*10 ⁷	4.623436*10 ⁻¹⁴	6.322427*10 ⁻¹⁴	1.094586*10 ⁻¹³
15	101991189	43.40	56.60	4.426418*10 ⁷	5.772701*10 ⁷	4.530474*10 ⁻¹⁴	5.898939*10 ⁻¹⁴	1.042941*10 ⁻¹³
16	90338345	45.10	54.90	4.074259*10 ⁷	4.959575*10 ⁷	4.170037*10 ⁻¹⁴	5.068031*10 ⁻¹⁴	9.238068*10 ⁻¹⁴
17	83257441	45.30	54.70	3.771562*10 ⁷	4.554182*10 ⁷	3.860224*10 ⁻¹⁴	4.653773*10 ⁻¹⁴	8.513997*10 ⁻¹⁴
18	80373285	39.80	60.20	3.198857*10 ⁷	4.838472*10 ⁷	3.274055*10 ⁻¹⁴	4.944279*10 ⁻¹⁴	8.218335*10 ⁻¹⁴
19	58617616	47.90	52.10	2.807784*10 ⁷	3.053978*10 ⁷	2.873789*10 ⁻¹⁴	3.120762*10 ⁻¹⁴	5.994551*10 ⁻¹⁴
20	64444167	43.90	56.10	2.829099*10 ⁷	3.615318*10 ⁷	2.895605*10 ⁻¹⁴	3.694378*10 ⁻¹⁴	6.589983*10 ⁻¹⁴
21	46709983	42.20	57.80	1.971161*10 ⁷	2.699837*10 ⁷	2.017499*10 ⁻¹⁴	2.758877*10 ⁻¹⁴	4.776376*10 ⁻¹⁴
22	50818468	47.70	52.30	2.424041*10 ⁷	2.657806*10 ⁷	2.481025*10 ⁻¹⁴	2.715927*10 ⁻¹⁴	5.196952*10 ⁻¹⁴
X	156040895	39.60	60.40	6.179219*10 ⁷	9.424870*10 ⁷	6.324481*10 ⁻¹⁴	9.630973*10 ⁻¹⁴	1.595545*10 ⁻¹³
Y	57227415	45.40	54.60	2.598125*10 ⁷	3.124617*10 ⁷	2.659201*10 ⁻¹⁴	3.192946*10 ⁻¹⁴	5.852147*10 ⁻¹⁴
Неразмещенные участки	183800000	44.30	55.70	8.142340*10 ⁷	1.023766*10 ⁸	8.333750*10 ⁻¹⁴	1.046154*10 ⁻¹³	1.879529*10 ⁻¹³
Митохондриальный геном (Мт)	16569	44.40	55.60	7.356636*10 ³	9.212364*10 ³	7.529576*10 ⁻¹⁸	9.413820*10 ⁻¹⁸	1.694340*10 ⁻¹⁷
Мт ДНК на клетку	4689027	44.40	55.60	2.081928*10 ⁶	2.607099*10 ⁶	2.130870*10 ⁻¹⁵	2.664111*10 ⁻¹²	4.794981*10 ⁻¹⁵
Мужской геном	6330871354	42.14	57.86	2.667829*10 ⁹	3.663042*10 ⁹	2.730545*10 ⁻¹²	3.743146*10 ⁻¹²	6.473622*10 ⁻¹²
Женский геном	6429684834	42.02	57.98	2.701754*10 ⁹	3.727931*10 ⁹	2.765266*10 ⁻¹²	3.809454*10 ⁻¹²	6.574656*10 ⁻¹²
Полный мужской геном (с Мт)	6335560381	42.19	57.81	2.672973*10 ⁹	3.662587*10 ⁹	2.735809*10 ⁻¹²	3.742681*10 ⁻¹²	6.478417*10 ⁻¹²
Полный женский геном (с Мт)	6434373861	42.07	57.93	2.706941*10 ⁹	3.727433*10 ⁹	2.770576*10 ⁻¹²	3.808944*10 ⁻¹²	6.579451*10 ⁻¹²
Средний геном	6380278094	42.14	57.86	2.688649*10 ⁹	3.691629*10 ⁹	2.751854*10 ⁻¹²	3.772357*10 ⁻¹²	6.524139*10 ⁻¹²
Полный средний геном	6384967121	42.19	57.81	2.693818*10 ⁹	3.691149*10 ⁹	2.757144*10 ⁻¹²	3.771868*10 ⁻¹²	6.528934*10 ⁻¹²

QIASymphony SP. Концентрация ДНК в каждом образце была измерена двумя методами – флуориметрическим на приборе Qubit 4.0 и спектрофотометрическим на приборе NanoDrop OneC. Для проверки нормальности распределения концентраций ДНК рассчитан тест Шапиро-Уилка (табл.1). Значение «р» и для Qubit 4.0 и для NanoDrop OneC было значительно больше 0,05, что позволило не отклонить нулевую гипотезу о нормальности распределения.

Были рассчитаны значения средней массы выделенной ДНК с 95% доверительным интервалом для Qubit 4.0 и NanoDrop OneC.

Так как измерения концентраций ДНК производились двумя принципиально разными методами, были проведены тест Фишера для проверки равенства дисперсий и парный тест Стьюдента для зависимых выборок для проверки равенства средних значений (табл. 3). Значение «р» F-критерия позволило не отклонить гипотезу о том, что дисперсии концентраций, измеренных двумя разными методами, равны, но р-значение парного теста Стьюдента для зависимых выборок потребовало отклонить предположение о равенстве средних величин. Поэтому дальнейший статистический анализ для результатов двух методов проведен раздельно.

Зависимость массы ДНК, выделенной из каждого образца, от содержания лейкоцитов представлена на рис. 1. Визуально видимую четкую зависимость подтверждают высокие коэффициенты корреляции Пирсона (0,85 для концентраций, измеренных Qubit, и 0,95 для концентраций, измеренных на NanoDrop OneC, оба коэффициента корреляции высоко достоверны ($p < 0.001$)).

На данных табл. 2 построены две линейные регрессионные модели, где в качестве зависимой переменной выступала концентрация ДНК (для первой модели – измеренная на Qubit 4.0, для второй – на NanoDrop OneC), а в качестве независимой переменной – число лейкоцитов в образце крови (табл. 4).

Полученные результаты позволили вывести формулы, предсказывающие ожидаемую концентрацию ДНК в зависимости от содержания лейкоцитов в крови. Если концентрация будет измеряться на Qubit, то формула имеет вид:

$$c_q = 8.2140 + 7.6385 * n_i,$$

Если концентрация будет измеряться на NanoDrop OneC, целесообразно пользоваться второй формулой:

$$c_n = 6.8187 + 8.7512 * n_i,$$

где c_q – концентрация ДНК при измерении ее на Qubit 4.0, c_n – концентрация ДНК при измерении ее

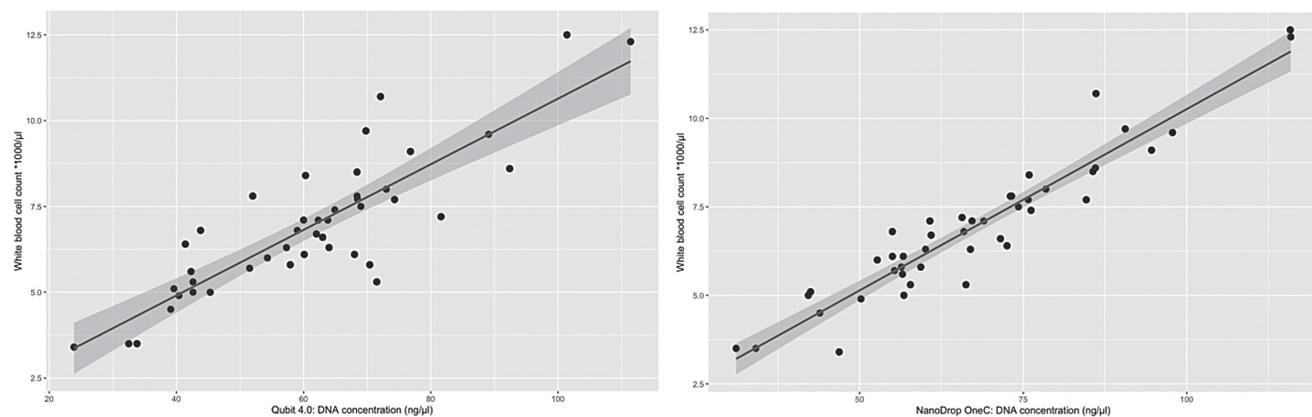


Рис. 1. Графики линейной зависимости между числом лейкоцитов в образцах крови и концентрацией ДНК, измеренной на каждом из приборов (слева – Qubit 4.0, справа – NanoDrop OneC).

Таблица 3

Концентрация ДНК, выделенной на станции QIASymphony SP и измеренной двумя методами

Прибор, использованный для измерения концентрации	р-значение t-теста Стьюдента	р-значение парного критерия Стьюдента	р-значение критерия Фишера	Средняя концентрация ДНК (нг/мкл)	Средняя масса ДНК (мг/мл крови)
Qubit 4.0	$< 2.2 * 10^{-16}$	0.000106	0.83	$61,04 \pm 5,51$	$30,52 \pm 2,76$
NanoDrop OneC	$< 2.2 * 10^{-16}$			$67,34 \pm 5,70$	$33,67 \pm 2,85$

на NanoDrop OneC, n_i – число лейкоцитов в образце крови.

С использованием этих формул мы рассчитали прогнозируемые значения концентраций и массы выделяемой ДНК для референсных значений (диапазон у здоровых индивидов) количества лейкоцитов (табл. 5). Из таблицы следует, что при выделении ДНК из 1 мл крови здоровых индивидов данным методом следует ожидать выход от 20 до 40 мг ДНК.

Расчет массы ДНК на лейкоцит крови

Для каждого образца, исходя из числа лейкоцитов в нем и измеренной на каждом из приборов концентрации ДНК, была рассчитана масса ДНК на лейкоцит (табл. 2). Для каждой из двух полученных выборок массы ДНК на лейкоцит была выполнена проверка на нормальность распределения. В обоих случаях р-значение теста Шапиро-Уилка было меньше 0,05, следовательно, распределение отличается от нормального, и в дальнейших вычислениях правильнее использовать медиану, а не среднее значение массы ДНК на лейкоцит.

Графики частот массы ДНК в лейкоцитах крови также подтверждают, что распределения массы ДНК при измерении концентрации ДНК на Qubit 4.0 и NanoDrop OneC отличаются от нормального (рис. 2).

Медианы выборки масс ДНК на лейкоцит могут быть использованы для расчета прогнозируемого значе-

ния массы ДНК при известном количестве лейкоцитов в образце крови (для каждого из методов измерения).

$$m_{DNA} = m_i * n_i,$$

где m_i – медиана массы ДНК лейкоцита, а n_i – количество лейкоцитов в образце крови.

Оценка потерь при выделении ДНК

Кроме описанных выше измерений реально выделенного количества ДНК для каждого образца мы провели расчет всей содержащейся в нем массы ДНК. Для этого число лейкоцитов было умножено на массу генома (табл. 2). Это масса ДНК, которая была бы выделена идеальным методом, при полном отсутствии потерь ДНК при выделении. Затем для каждого образца было рассчитано отношение (*ratio*) реальной массы выделенной ДНК к ее «идеальной» массе. Средняя по всем образцам доля выделенной ДНК составила 68% (при измерении на Qubit) и 74% при измерении на NanoDrop OneC. Так как распределение *ratio* для обоих методов измерения концентрации ДНК отличается от нормального (р-значение теста Шапиро-Уилка < 0,05), то правильнее использовать не среднее, а медиану значений, которые, впрочем, очень близки: 68% (при измерении на Qubit) и 75% при измерении на NanoDrop OneC. Потери ДНК при использовании станции QIASymphony SP, соответственно, составляют 25–32%, то есть при выделении теряется около четверти ДНК.

Таблица 4

Параметры линейной регрессии зависимости концентрации ДНК от числа лейкоцитов в образце.

Метод выделения ДНК	Коэффициенты (для NanoDrop OneC)	Значение	Стандартная ошибка	t-значение	p-значение
Qubit 4.0	Свободный член	8,2140	5,1620	1,591	0,119
Qubit 4.0	Угловой коэффициент при переменной «Количество лейкоцитов»	7,6385	0,7169	10,656	1,63*10 ⁻¹³
NanoDrop OneC	Свободный член	6,8187	3,3057	2,063	0,0454
NanoDrop OneC	Угловой коэффициент при переменной «Количество лейкоцитов»	8,7512	0,4591	19,063	< 2*10 ⁻¹⁶

Таблица 5

Прогнозируемые концентрация и масса ДНК при выделении на магнитных частицах при нормальном содержании лейкоцитов в крови

Число лейкоцитов (тыс/мкл крови)	Прогнозируемые значения концентрации ДНК (нг/мкл крови)		Прогнозируемый диапазон массы ДНК (мг/мл крови)	
	Qubit 4.0	NanoDrop OneC	Qubit 4.0	NanoDrop OneC
4	38,77	41,82	19,39	20,91
9	76,96	85,58	38,48	42,79

Обсуждение

Бурное развитие молекулярно-генетических областей медицины, требующих больших выборок стандартизованных образцов ДНК, приводит к широкомасштабному внедрению автоматизации самых разных этапов данных исследований. Одним из базовых этапов является выделение ДНК, в данном случае приобретающее черты конвейерного. Как любое исследование, поставленное на поток, данный метод нуждается в опорных точках верификации его качества. Знание стандартного диапазона массы ДНК поможет спрогнозировать ее количество при планировании исследования и оценить качество экстракции, уже выполненной с использованием данного метода. А зная количество лейкоцитов в образцах крови, можно будет достаточно точно предугадать и оценить массовый выход ДНК для каждого конкретного образца.

Поэтому в нашем исследовании проведен разносторонний, количественный анализ процесса выделения ДНК с использованием наиболее производительной системы – выделения на магнитных частицах с помощью роботизированной станции QIAasymphony SP. Мы показали, что масса получаемой ДНК почти целиком определяется содержанием лейкоцитов в крови, вывели формулы, позволяющие прогнозировать концентрацию ДНК в зависимости от уровня лейкоцитов, оценили потери при выделении и т.д.

Нужно отметить, что референсные значения нормы лейкоцитов в крови несколько отличаются для разных стран. Более того, эти нормы пересматриваются время от времени, что приводит к изменениям стандартов в одной и той же стране. Так, например, норма лейкоцитов для Франции – 4–10 тыс/мкл [29]. Для Великобритании нормальные значения числа лейкоцитов

в крови – 4–11 тыс/мкл [30]. В США референсные значения содержания лейкоцитов в крови – 4500–11000 на мкл [31]. В США также принято учитывать тот факт, что число лейкоцитов у людей африканского происхождения ниже, чем у остального населения страны по причине часто встречающейся доброкачественной нейтропении, при которой количество лейкоцитов постоянно низкое, поэтому для афроамериканцев границы нормы лежат в пределах от 3,2 до 10 тыс/мкл [32,33]. В данной работе мы использовали российский стандарт – от 4 до 9 тыс/мкл [34]. При этом возможно, что содержание лейкоцитов варьирует у представителей различных этнических популяций России в связи с различиями их генофонда, традиционного типа питания и т.д., поэтому в практике популяционных исследований может потребоваться ввести корректировки на выход ДНК при работе с образцами из различных регионов России.

Измерение концентрации было произведено двумя принципиально разными методами: с помощью набора Qubit™ dsDNA BR на флуориметре Qubit 4.0 и спектрофотометрическим методом на анализаторе NanoDrop OneC (оба прибора произведены компанией Thermo Fisher). Важным является тот факт, что в отличие от более ранних версий NanoDrop, результат, сообщаемый прибором версии OneC, является уже скорректированным: прибор автоматически идентифицирует загрязняющие агенты, рассчитывает поправку на их наличие. Предположительно, именно по этой причине в нашем исследовании NanoDrop OneC, показал лучший результат корреляции концентрации ДНК с числом лейкоцитов в образцах крови, чем Qubit 4.0. Это наблюдение было новым и может иметь значение в практике ДНК-лабораторий.

Что касается рассчитанной в нашей работе средней массы ДНК лейкоцита крови, то результат, разумеется,

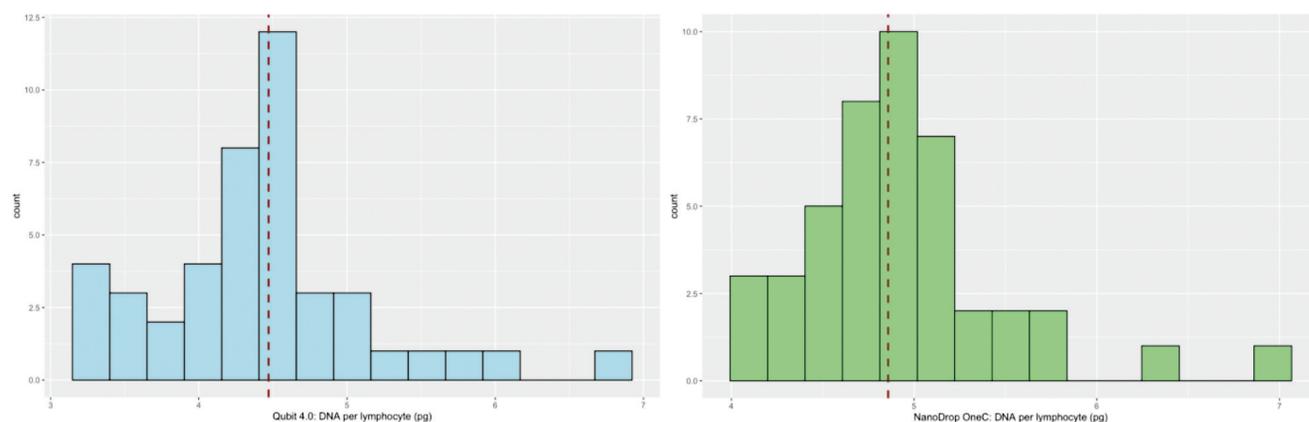


Рис. 2. Гистограммы частот массы ДНК на лейкоцит для всех образцов (голубой график – для Qubit 4.0, зеленый график – для NanoDrop OneC), темно-красная пунктирная линия – медиана частот массы ДНК на лейкоцит.

близок к ранее опубликованным [23, 24], но лучше подходит для задач нашей работы. Во-первых, расчет был произведен на основе данных последней сборки генома с уточненными длиной хромосом и GC-составом, в то время как, например, в работе [23] состав GC и AT был взят из расчета, что в хромосомах содержится равное количество пар нуклеотидов каждого типа, а в [24] расчет массы генома был произведен на основе данных статьи [39], где GC-состав приведен не полностью. Во-вторых, благодаря данным о копийности мтДНК в лейкоцитах крови [28] удалось точнее оценить массу митохондриальной ДНК, характерную для лейкоцита человека, так как число копий ДНК может сильно различаться в разных тканях [40], что тоже отличает нашу работу от исследований [23] и [24].

Наши результаты показали, что средние значения концентрации ДНК для выбранных нами двух разных методов измерения значимо отличаются, поэтому расчет прогнозируемого количества ДНК должен производиться с учетом планируемого метода измерения концентрации. Если же нужно грубо оценить массу выделяемой ДНК, то можно воспользоваться рассчитанным нами диапазоном массы определяемой ДНК для референсных значений числа лейкоцитов в крови. При этом диапазон значений концентраций ДНК для каждого конкретного случая будет получен путем деления крайних значений диапазона рассчитанных нами чистых масс ДНК на объем элюирующего раствора, которых был использован для ее разведения.

Определена масса ДНК, содержащаяся в одном миллилитре крови. Это позволило оценить потери при выделении ДНК (для данного метода потери составляют около четверти всей массы ДНК). Полученные величины также сообщают исследователю максимально возможную концентрацию ДНК, независимо от метода выделения.

Полезным результатом представляется также испытание новой модели популярного прибора Nanodrop — благодаря встроенному алгоритму идентификации примесей и автоматической коррекции концентрации ДНК, этот прибор в наших экспериментах оказался даже точнее, чем флуориметр Qubit, признаваемый как наиболее авторитетный метод определения концентрации большинством российских лабораторий, проводящих высокопроизводительное секвенирование.

Литература

- Müller H., Dagher G., Loibner M., et al. Biobanks for life sciences and personalized medicine: importance of standardization, biosafety, biosecurity, and data management. *Current Opinion in Biotechnology*. 2020;. 65: 45–51.
- Coppola L., Cianflone A., Grimaldi A.M., et al. Biobanking in health care: Evolution and future directions [Internet]. *Journal of Translational Medicine*. 2019; 17: 172.
- Baber R., Kiehnopf M. Automation in biobanking from a laboratory medicine perspective. *J Lab Med*. 2019; 43(6):329–38.
- Szcepek A.J., Frejo L., Vona B., et al. Recommendations on Collecting and Storing Samples for Genetic Studies in Hearing and Tinnitus Research. *Ear Hear*. 2019;40(2):219–26.
- Qamar W., Khan M.R., Arafah A. Optimization of conditions to extract high quality DNA for PCR analysis from whole blood using SDS-proteinase K method. *Saudi J Biol Sci*. 2017; 24(7):1465–9.
- Griffiths L., Chacon-Cortes D. Methods for extracting genomic DNA from whole blood samples: current perspectives. *J Biorepository Sci Appl Med*. 2014;2:1.
- Dairawan M., Shetty P.J. The Evolution of DNA Extraction Methods. 2020;(1):2020–8.
- Psifidi A., Dovas C.I., Bramis G., et al. Comparison of Eleven Methods for Genomic DNA Extraction Suitable for Large-Scale Whole-Genome Genotyping and Long-Term DNA Banking Using Blood Samples. *PLoS One*. 2015;10(1):e0115960.
- Looi M.L., Zakaria H., Osman J., et al. Quantity and quality assessment of DNA extracted from saliva and blood. *Clin Lab*. 2012;58(3–4):307–12.
- Петров Д.Г., Макарова Е.Д., Гермаш Н.Н., и др. Эффективные методы выделения нуклеиновых кислот для проведения анализов в молекулярной биологии. *Научное Приборостроение*. 2010;20(1):3–9.
- DNA Purification | DNA Extraction Methods | Promega [Internet]. [cited 2020 Jun 28]. Available from: <https://worldwide.promega.com/resources/guides/nucleic-acid-analysis/dna-purification/>
- Gong R., Li S. Extraction of human genomic DNA from whole blood using a magnetic microsphere method. *Int J Nanomedicine*. 2014;9(1):3781–9.
- Laus S., Kingsley L.A., Green M., et al. Comparison of QIAasymphony automated and QIAamp manual DNA extraction systems for measuring epstein-barr virus DNA load in whole blood using real-time PCR. *J Mol Diagnostics*. 2011;13(6):695–700.
- Kruhoffer M., Voss T., Beller K., et al. Evaluation of the QIAasymphony SP Workstation for Magnetic Particle—Based Nucleic Acid Purification from Different Sample Types for Demanding Downstream Applications. *J Lab Autom*. 2010;15(1):41–51.
- Spalletti-Cernia D., Barbato S., Sorrentino R., et al. Evaluation of the Automated QIAasymphony SP/AS Workflow for Cytomegalovirus DNA Extraction and Amplification from Dried Blood Spots. *Intervirology*. 2016;59(4):211–6.
- Parham N.J., Parmar S.A., Kumar N., et al. Automated nucleic acid isolation in viral molecular diagnostics: Evaluation of the QIAasymphony SP. *Br J Biomed Sci*. 2012;69(1):18–25.
- Youssef O., Poizot-Martin I., Taouqi M., et al. Optimization of automated germline DNA extraction from non-tumoral formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) tissues. Vol. 30, Abstract Book of the 44th ESMO Congress (ESMO 2019) 27 September – 1 October 2019, Barcelona, Spain. 2019.
- Biobank Côte d'Azur human collection [Internet]. [cited 2020 Jun 27]. Available from: <http://www.biobank-cotedazur.fr/en/biobanking.cfm>
- CCG: Cologne Center for Genomics (CCG) [Internet]. [cited 2020 Jun 28]. Available from: <https://ccg.uni-koeln.de/>
- Services – Institute of Translational Medicine – University of Liverpool [Internet]. [cited 2020 Jun 27]. Available from: <https://www.liverpool.ac.uk/translational-medicine/research/lbih/services/>
- Проект Российские геномы | Санкт-Петербургский Государственный Университет [Internet]. [cited 2020 Jun 27]. Available from: <http://genomerussia.spbu.ru/>
- R: The R Project for Statistical Computing [Internet]. [cited 2020 Jun 28]. Available from: <https://www.r-project.org/>

23. Doležel J., Bartoš J., Voglmayr H., et al. Letter to the editor. Cytometry. 2003;51A(2):127–8.
24. Piovesan A., Pelleri M.C., Antonaros .F, et al. On the length, weight and GC content of the human genome. BMC Res Notes. 2019;12(1):106.
25. GRCh38.p13 – Genome – Assembly – NCBI [Internet]. [cited 2020 Jun 27]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/51>
26. Fundamental physical constants. Nature. 1930; 126: 111.
27. Homo sapiens (ID 51) – Genome – NCBI [Internet]. [cited 2020 Jun 27]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/51>
28. Fazzini F., Schöpf B., Blatzer M., et al. Plasmid-normalized quantification of relative mitochondrial DNA copy number. Sci Rep. 2018;8(1):1–11.
29. Leucocytes trop bas ou trop élevés : que faire ? – Top Santé [Internet]. [cited 2020 Jun 27]. Available from: <https://www.topsante.com/medecine/analyses-de-sang/leucocytes-taux-trop-bas-ou-trop-eleves>
30. Haematology Normal Adult Reference Ranges [Internet]. [cited 2020 Jun 27]. Available from: <https://www.royalwolverhampton.nhs.uk/services/service-directory-a-z/pathology-services/departments/haematology/haematology-normal-adult-reference-ranges/>
31. Table 1, Complete blood count – Blood Groups and Red Cell Antigens – NCBI Bookshelf [Internet]. [cited 2020 Jun 27]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2263/table/ch1.T1/>
32. White blood cell count. Nurs Crit Care [Internet]. 2019 Jan [cited 2020 Jun 27];14(1):40. Available from: https://journals.lww.com/nursing-criticalcare/Fulltext/2019/01000/White_blood_cell_count.7.aspx
33. Reich D., Nalls M.A., Kao W.H.L., et al. Reduced neutrophil count in people of African descent is due to a regulatory variant in the Duffy antigen receptor for chemokines gene. PLoS Genet. 2009;5(1).
34. Кишкун А. Руководство по лабораторным методам диагностики. ГЭОТАР-мед. Москва; 2007.
35. Гематологические анализаторы Micros: принципиальные отличия и поддерживаемые функции [Internet]. [cited 2020 Jun 27]. Available from: <http://medbuy.ru/articles/chem-otlichayutsya-gematologicheskie-analizatory-micros-ot-svoih-analogov>
36. Qubit™ dsDNA BR Assay Kit [Internet]. [cited 2020 Jun 27]. Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/Q32850#/Q32850>
37. NanoDrop Products Guide | Thermo Fisher Scientific – RU [Internet]. [cited 2020 Jun 27]. Available from: <https://www.thermofisher.com/ru/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/molecular-spectroscopy/ultraviolet-visible-visible-spectrophotometry-uv-vis-vis-uv-vis-vis-instruments/nanodrop-microvolume-spectrophotometers/nanodrop-products-guide.html?SID=-fr-nanodrop-1>
38. Балановский О.П., Кагазежева Ж.А., Олькова М.В. Методы измерения концентрации ДНК: совпадение относительных величин и различия абсолютных. Вестник Российского государственного медицинского университета. 2019;(3):27–33.
39. Schneider V.A., Graves-Lindsay T., Howe K., et al. Evaluation of GRCh38 and de novo haploid genome assemblies demonstrates the enduring quality of the reference assembly. Genome Res. 2017;27(5):849–64.
40. D’Erchia A.M., Atlante A., Gadaleta G., et al. Tissue-specific mtDNA abundance from exome data and its correlation with mitochondrial transcription, mass and respiratory activity. Mitochondrion. 2015;20:13–21.
2. Coppola L., Cianflone A., Grimaldi A.M., et al. Biobanking in health care: Evolution and future directions [Internet]. Journal of Translational Medicine. 2019; 17: 172.
3. Baber R., Kiehntopf M. Automation in biobanking from a laboratory medicine perspective. J Lab Med. 2019; 43(6):329–38.
4. Szczepek A.J., Frejo L., Vona B., et al. Recommendations on Collecting and Storing Samples for Genetic Studies in Hearing and Tinnitus Research. Ear Hear. 2019;40(2):219–26.
5. Qamar W., Khan M.R., Arafah A. Optimization of conditions to extract high quality DNA for PCR analysis from whole blood using SDS-proteinase K method. Saudi J Biol Sci. 2017; 24(7):1465–9.
6. Griffiths L., Chacon-Cortes D. Methods for extracting genomic DNA from whole blood samples: current perspectives. J Biorepository Sci Appl Med. 2014;2:1.
7. Dairawan M., Shetty P.J. The Evolution of DNA Extraction Methods. 2020;(1):2020–8.
8. Psifidi A., Dovas C.I., Bramis G., et al. Comparison of Eleven Methods for Genomic DNA Extraction Suitable for Large-Scale Whole-Genome Genotyping and Long-Term DNA Banking Using Blood Samples. PLoS One. 2015;10(1):e0115960.
9. Looi M.L., Zakaria H., Osman J., et al. Quantity and quality assessment of DNA extracted from saliva and blood. Clin Lab. 2012;58(3–4):307–12.
10. Petrov D.G., Makarova Ye.D., Germash N.N., et al. Effektivnyye metody vydeleniya nukleinovyykh kislot dlya provedeniya analizov v molekulyarnoy biologii [Effective methods for the isolation of nucleic acids for analyzes in molecular biology]. Nauchnoye Priborostryeniye. [Scientific Instrumentation].2010;20(1):3–9. (In Russ.)
11. DNA Purification | DNA Extraction Methods | Promega [Internet]. [cited 2020 Jun 28]. Available from: <https://worldwide.promega.com/resources/guides/nucleic-acid-analysis/dna-purification/>
12. Gong R., Li S. Extraction of human genomic DNA from whole blood using a magnetic microsphere method. Int J Nanomedicine. 2014;9(1):3781–9.
13. Laus S., Kingsley L.A., Green M., et al. Comparison of QIAAsymphony automated and QIAamp manual DNA extraction systems for measuring epstein-barr virus DNA load in whole blood using real-time PCR. J Mol Diagnostics. 2011;13(6):695–700.
14. Kruhoffer M., Voss T., Beller K., et al. Evaluation of the QIAAsymphony SP Workstation for Magnetic Particle–Based Nucleic Acid Purification from Different Sample Types for Demanding Downstream Applications. J Lab Autom. 2010;15(1):41–51.
15. Spalletti-Cernia D., Barbato S., Sorrentino R., et al. Evaluation of the Automated QIAAsymphony SP/AS Workflow for Cytomegalovirus DNA Extraction and Amplification from Dried Blood Spots. Intervirology. 2016;59(4):211–6.
16. Parham N.J., Parmar S.A., Kumar N., et al. Automated nucleic acid isolation in viral molecular diagnostics: Evaluation of the QIAAsymphony SP. Br J Biomed Sci. 2012;69(1):18–25.
17. Youssef O., Poizot-Martin I., Taouqi M., et al. Optimization of automated germline DNA extraction from non-tumoral formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) tissues. Vol. 30, Abstract Book of the 44th ESMO Congress (ESMO 2019) 27 September – 1 October 2019, Barcelona, Spain. 2019.
18. Biobank Côte d’Azur human collection [Internet]. [cited 2020 Jun 27]. Available from: <http://www.biobank-cotedazur.fr/en/biobanking.cfm>
19. CCG: Cologne Center for Genomics (CCG) [Internet]. [cited 2020 Jun 28]. Available from: <https://ccg.uni-koeln.de/>
20. Services – Institute of Translational Medicine – University of Liverpool [Internet]. [cited 2020 Jun 27]. Available from: <https://www.liverpool.ac.uk/translational-medicine/research/lbih/services/>
21. Проект Rossiyskiye genomy/Sankt-Peterburgskiy Gosudarstvennyy Universitet [Russian Genomes Project/Saint Petersburg State University] [Internet]. [cited 2020 Jun 27]. Available from: <http://genomerussia.spbu.ru/> (In Russ.)

References

1. Müller H., Dagher G., Loibner M., et al. Biobanks for life sciences and personalized medicine: importance of standardization, biosafety, biosecurity, and data management. Current Opinion in Biotechnology. 2020;. 65: 45–51.

22. R: The R Project for Statistical Computing [Internet]. [cited 2020 Jun 28]. Available from: <https://www.r-project.org/>
23. Doležel J., Bartoš J., Voglmayr H., et al. Letter to the editor. *Cytometry*. 2003;51A(2):127–8.
24. Piovesan A., Pelleri M.C., Antonaros .F, et al. On the length, weight and GC content of the human genome. *BMC Res Notes*. 2019; 12(1):106.
25. GRCh38.p13 – Genome – Assembly – NCBI [Internet]. [cited 2020 Jun 27]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCA_000001405.28
26. Fundamental physical constants. *Nature*. 1930; 126: 111.
27. Homo sapiens (ID 51) – Genome – NCBI [Internet]. [cited 2020 Jun 27]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/51>
28. Fazzini F., Schöpf B., Blatzer M., et al. Plasmid-normalized quantification of relative mitochondrial DNA copy number. *Sci Rep*. 2018;8(1):1–11.
29. Leucocytes trop bas ou trop élevés : que faire? – Top Santé [Internet]. [cited 2020 Jun 27]. Available from: <https://www.topsante.com/medecine/analyses-de-sang/leucocytes-taux-trop-bas-ou-trop-eleves>
30. Haematology Normal Adult Reference Ranges [Internet]. [cited 2020 Jun 27]. Available from: <https://www.royalwolverhampton.nhs.uk/services/service-directory-a-z/pathology-services/departments/haematology/haematology-normal-adult-reference-ranges/>
31. Table 1, Complete blood count – Blood Groups and Red Cell Antigens – NCBI Bookshelf [Internet]. [cited 2020 Jun 27]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2263/table/ch1.T1/>
32. White blood cell count. *Nurs Crit Care* [Internet]. 2019 Jan [cited 2020 Jun 27];14(1):40. Available from: https://journals.lww.com/nursing-criticalcare/Fulltext/2019/01000/White_blood_cell_count.7.aspx
33. Reich D., Nalls M.A., Kao W.H.L., et al. Reduced neutrophil count in people of African descent is due to a regulatory variant in the Duffy antigen receptor for chemokines gene. *PLoS Genet*. 2009;5(1).
34. Kishkun A. *Rukovodstvo po laboratornym metodam diagnostiki. [Guidance on laboratory diagnostic methods]* GEOTAR-med. Moscow; 2007. (In Russ.)
35. Gematologicheskiye analizatory Micros: printsipial'nyye otlichiya i podderzhivayemye funktsii [Micros Hematology Analyzers: Key Differences and Supported Features] [Internet]. [cited 2020 Jun 27]. Available from: <http://medbuy.ru/articles/chem-otlichayutsya-gematologicheskie-analizatory-micros-ot-svoih-analogov> (In Russ.)
36. Qubit™ dsDNA BR Assay Kit [Internet]. [cited 2020 Jun 27]. Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/Q32850#/Q32850>
37. NanoDrop Products Guide | Thermo Fisher Scientific – RU [Internet]. [cited 2020 Jun 27]. Available from: <https://www.thermofisher.com/ru/ru/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/molecular-spectroscopy/ultraviolet-visible-visible-spectrophotometry-uv-vis-vis/uv-vis-vis-instruments/nanodrop-microvolume-spectrophotometers/nanodrop-products-guide.html?SID=fr-nanodrop-1>
38. Balanovskiy O.P., Kagazezheva ZH.A., Ol'kova M.V. Metody izmereniya kontsentratsii DNK: sovpadeniye otnositel'nykh velichin i razlichiya absolyutnykh [Methods for measuring DNA concentration: coincidence of relative values and differences in absolute values]. *Vestnik Rossiyskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta [Bulletin of the Russian State Medical University]*. 2019;(3):27–33. (In Russ.)
39. Schneider V.A., Graves-Lindsay T., Howe K., et al. Evaluation of GRCh38 and de novo haploid genome assemblies demonstrates the enduring quality of the reference assembly. *Genome Res*. 2017; 27(5):849–64.
40. D'Erchia A.M., Atlante A., Gadaleta G., et al. Tissue-specific mtDNA abundance from exome data and its correlation with mitochondrial transcription, mass and respiratory activity. *Mitochondrion*. 2015;20:13–21.