

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

\_\_\_\_\_ В.А. Кратасюк

« \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2021 г.

**БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**

**06.03.01 Биология**

**Разработка метода сбора и сохранения РНК в сухих пятнах крови человека**

Руководитель

\_\_\_\_\_

подпись, дата

д-р ф.м.н. С. В. Столяр

Научный консультант

\_\_\_\_\_

подпись, дата

к.м.н. И.А. Ольховский

Выпускник

\_\_\_\_\_

подпись, дата

Е. А. Плечко

Красноярск 2021

## РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа по теме “Разработка метода сбора и сохранения РНК в сухих пятнах крови человека” содержит 30 страниц текстового документа, 5 иллюстраций, 1 таблицу и 25 использованных источников.

ЛЕЙКОЗ, РНК, СУХИЕ ПЯТНА КРОВИ, ТРАНСКРИПТ ГЕНА BCR-ABL, ПЦР, ДОП-ПЦР

Цель работы - разработать методику улучшения выделения РНК из пятен крови для проведения молекулярно-генетических исследований. Для достижения поставленной цели были обозначены следующие задачи:

1. Определить влияние различных химических растворов нанесенных на бумажный фильтр стабильность РНК.
2. Определить возможность использования метода DOP-PCR для неспецифического увеличения концентрации молекул РНК.

Актуальность исследования обусловлена проблемой выделения РНК из сухих пятен крови для молекулярно-генетических исследований. Концентрация выделенной РНК из сухих пятен крови уступает концентрации РНК выделенной из цельной крови, вследствие деградации РНК за счёт действия на неё нуклеаз.

В результате проведённых работ оптимизирован метод сохранения выделения РНК из сухих пятен крови с помощью методики ДОП-ПЦР. При этом удалось амплифицировать большее количество молекул РНК в сравнении с образцами сухих пятен крови без применения данной методики.

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	4
1. Обзор литературы .....	6
1.1 Лейкоз.....	6
1.2 Рибонуклеиновая кислота .....	7
1.3 Выделение РНК.....	8
1.4 Стабилизация РНК.....	10
1.5 Сухие пятна крови .....	11
2. Материалы и методы .....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
2.1 Объект исследования .....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
2.2 Приготовление сухих пятен крови.....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
2.3 Приготовление стабилизирующих растворов для обработки карточек	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
2.4 Выделение РНК с использованием набора “Нуклео-Экстран РНК”	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
2.5 Проведение ПЦР .....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
2.6 Проведение электрофореза.....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
2.7 Статистический анализ.....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
3. Результаты и обсуждения.....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
3.1. Результаты по электрофорезу .....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
3.2. Результаты по обработке карточек стабилизирующим раствором	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
3.3. Результаты по проведению реакции ДОП-ПЦР и ПЦР-РВ.....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
ВЫВОДЫ .....	15
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....	16
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	17

## **ВВЕДЕНИЕ**

Молекулярно-генетические исследования делают возможности медицины практически безграничными. Они основаны на детальном изучении генома человека, функции ДНК позволяют установить причины многих болезней, передающихся по наследству. Какие-либо изменения в структуре гена приводят к структурным биохимическим нарушениям в организме человека. Выявление различных мутаций позволяет разработать качественную диагностику и профилактику наследственных заболеваний. Для всех молекулярно-генетических исследований необходимо сдавать биоматериал. Чаще всего этим биоматериалом является кровь, из которой выделяются нуклеиновые кислоты для исследования повреждений в геноме. ДНК – макромолекула, которая хранит информацию о структуре различных белков, поэтому чаще всего именно она используется в лабораторных исследованиях. Для выявления некоторых мутаций требуется выделять РНК для исследования. Около 5 мл крови забирают у пациентов для одного анализа, что считается достаточно большим объемом. Вакутейниры с цельной кровью требуют определенных условий хранения, а кровь необходимо использовать для анализа в течение первых 24 часов. При этом для пациентов из поселков, отдаленных городов необходимо приезжать в медицинские центры для сдачи крови. Это приводит к различным затруднениям для маломобильных, пожилых людей. В медицине существует технология сухих пятен крови – метод, основанный на сохранении биоматериала на бумажном фильтре. Преимущества данного метода заключаются в том, что используется небольшой объем крови, не требуются специальные условия ее хранения, срок годности образцов увеличен до одного года, пациентам из отдаленных районов можно отправлять по почте в лабораторию. Однако существует и проблема. Выделение РНК из сухих пятен крови затруднено тем, что эта молекула является нестабильной, поэтому на

сухих образцах происходит воздействие нуклеаз на РНК, что приводит к деградации молекулы.

Для решения данной проблемы нашей целью является разработать методику улучшения выделения РНК из пятен крови для проведения молекулярно-генетических исследований. Для достижения поставленной цели были обозначены следующие задачи:

1. Определить влияние различных химических растворов нанесенных на бумажный фильтр стабильность РНК.
2. Использовать метод DOP-PCR для неспецифического увеличения концентрации РНК.

## **1. Обзор литературы**

### **1.1 Лейкоз**

Ведущее место среди онкологических заболеваний среди детей до 15 лет занимают лейкозы [1]. Острый лейкоз – это злокачественное заболевание кроветворной системы, к которому относится большая группа заболеваний, характеризующихся повышенным содержанием морфологически незрелых – бластных – клеток крови. Эти клетки не могут выполнять нормальные функции зрелых клеток, а также вытесняют здоровые клетки-предшественники. Особенностью данной онкологии служит быстрое распространение опухолевых клеток крови по кроветворному руслу во внутренние органы и селезенку. Также опухолевые клетки начинают размножаться на более поздних стадиях гемопоэза, нежели здоровые клетки, начинают бесконечно размножаться и замещать здоровые клетки костного мозга и крови [2]. К хроническому лейкозу относят злокачественный заболевания системы крови, в которых характерна мутация на уровне полипотентной стволовой клетки. Новые клетки созревают из практически зрелых или уже зрелых клеток, в результате количество мутационных клеток растет медленно, а также могут нести специализированные функции. Без лечения патологические клетки в костном мозге полностью заменят здоровые клетки.

Различают два вида комплекса кроветворения: лимфопоэз (образование лимфоцитов) и миелопоэз (образование других кровяных элементов). При повреждении ростка кроветворения выделяют два типа лейкоза: лимфоидные и миелоидные. По типу клинического течения делятся на острые и хронические [3].

В генетической основе развития лейкозов лежит структурные изменения хромосомы. В больших случаях встречается транслокация – один из видов

хромосомной аберрации, где происходит перенос участка хромосомы на негомологичную хромосому. Данное структурное изменение приводит к образованию химерного гена – транскрипта [4]. Экспрессия слитого гена влечет за собой появление химерной мРНК и химерного белка, которые могут служить маркерами злокачественных клеток [5].

При транслокации  $t(9;22)(q34;q11)$ , осуществляется взаимодействие между 9 и 22 хромосомой. В хромосоме 22 в гене BCR есть два основных участка разрыва: M-bcr (major)-между 12 и 16 экзонами и m-bcr (minor)- в первом интроне. На 9 хромосоме в гене ABL есть только один участок разрыва: в первом интроне. Транслокация по M-bcr приводит к синтезу химерного белка BCR-ABL-p210, характерного для хронического миелоидного лейкоза, а транслокация по m-bcr – к появления химерного белка BCR-ABL- p190, который специфичен для острого лимфоидного лейкоза [6,7]. При проведении молекулярно-генетического анализа требуется получить биологические макромолекулы в чистом виде.

## **1.2 Рибонуклеиновая кислота**

Нуклеиновые кислоты (НК) – это биополимеры, которые состоят из мононуклеотидов, соединенных в цепь друг с другом с помощью 3',5'-фосфодиэфирных связей. Эти биологические макромолекулы разделяют на две группы кислот: рибонуклеиновая (РНК) и дезоксирибонуклеиновая (ДНК). В последовательности нуклеотидов данных биополимеров записана генетическая информация биологического объекта. Молекула РНК представляет линейные полинуклеотиды, которые в своей структуре имеют четыре вида нуклеозидных остатков, таких как аденозин, гуанозин, цитидин и уридин, связанных между собой 3',5'- фосфодиэфирной связью. РНК можно разделить на два класса - не кодирующую и кодирующую. К первому классу относятся несколько типов РНК. Транспортная РНК (тРНК) переносит аминокислоты к рибосоме для синтеза белков. Для формирования малых и больших субъединиц рибосом необходима рибосомальная РНК (рРНК). Ко второму классу относится

информационная или матричная РНК (мРНК), которая обеспечивает перенос генетической информации от ДНК к рибосоме, где синтезируется первичный белок, а также участвует в его сборке [8]. Известно, что мРНК является неустойчивой молекулой к действию нуклеаз из-за своей структуры, нежели ДНК, а также РНКазы менее лабильны к денатурации, чем ДНКазы [9]. Получение полноразмерной мРНК затрудняется из-за действия на нее нуклеаз. Для этого используются различные ингибиторы РНКаз при выделении РНК.

### **1.3 Выделение РНК**

Аmplификация, обратная транскрипция, сиквенс, синтез РНК являются методами, относящимися к биохимическим процессам, которые не могут проходить на биологических материалах, а требуют экстракции биологических макромолекул. Важным предварительным шагом перед молекулярно-диагностическими процессами является правильное выделение рибонуклеиновой кислоты из различных клеток, в частности из клеток крови человека. Для этого необходимо извлечь достаточное количество высококачественной РНК для синтеза кДНК и последующей амплификации ПЦР-РВ. Экстракция РНК может осуществляться различными методами, которые отличаются по выходу, качеству и целостности РНК. Оптимальную методику выбирают исходя из поставленной задачи. Основными критериями выбора выделения РНК из биологического материала являются высокий выход и качество нужного материала, а также время получения требуемого продукта [10].

В научной литературе описано множество методов, позволяющих выделить рибонуклеиновую кислоту из разнообразных биологических материалов, но не все методы пригодны для экстракции из крови.

Основные методы выделения РНК можно разделить на сорбционные и несорбционные методики.

Классическим выделением является фенол-хлороформный метод экстракции РНК из клеток крови человека. Данный способ основан на лизисе



биологического материала детергентами или хаотропными веществами. После разрушения клеточной мембраны используются органические растворители - фенол и хлороформ. В пробирке формируются две фазы: верхняя фаза (водная) содержит РНК, а в нижней (органической) – белки [11]. Этот метод включает несколько стадий центрифугирования, заморозки и жидкостной экстракции, в связи с чем этот способ нельзя автоматизировать, является трудоемким и используются токсичные химические реагенты [12].

К несорбционному методу выделения также относят использование солевых растворов (высаливание). В начале протокола необходимо произвести лизирование и переваривание протеиназой К клеток крови. К последующей стадии добавить соли лития (LiCl). После центрифугирования смесь разделяется на две фазы, где супернатант содержит необходимую нам молекулу РНК, а белки и ДНК осаждаются на дно пробирки [13].

В сорбционных методах выделения РНК используются твердофазные системы, адсорбирующую нуклеиновую кислоту. Такие системы приготовлены на основе кварца, анионообменного носителя или стеклянного волокна, которые используются в хроматографических сепарационных колонках [14].

Например, метод выделения РНК на стекле [15]. На начальном этапе клетки лизируются сильным хаотропным веществом, которым могут быть гуанидин хлорид или тиоцианат, вследствие чего разрушаются клеточные мембраны. НК сорбируется на носителе, таком как стеклянные бусы, диатомовая земля и т.д., а связывание белков с матрицей не происходит. Отмывка происходит с помощью хаотропной соли – 80% этанол. РНК снимается со стекла с помощью низко ионного буфера. Также вместо стекол для выделения можно использовать колонки со стеклянной матрицей, который включают в себя стадии центрифугирования.

Полноразмерную поли(А) мРНК можно выделить с помощью магнитных частиц [16]. Данная методика включает в себя два этапа проведения процедуры. Сперва поли(А) мРНК связывается с биотинилированным зондом, но возможно не полное связывание РНК с ним. На втором этапе магнитные частицы со

стрептовидином связываются с данными зондами, несущие на себе РНК.

Все вышеперечисленные способы имеют общий недостаток, который обусловлен потерей части РНК при отделении нецелевых фракций.

#### **1.4 Стабилизация РНК**

Методы молекулярной диагностики используют предпочтительней периферическую кровь для диагностики заболеваний или наблюдения состояния пациентов после лечения. В лучшем случае РНК извлекается сразу после взятия пробы крови, чтобы предотвратить деградацию и добиться оптимального обнаружения и количественной оценки [17]. Для стабилизации молекул разработаны различные коммерческие наборы со стабилизирующим реагентом. Также известны другие вещества, которые не позволяют разрушить молекулу РНК.

В РНК при втором углеродном атоме (С2') находится гидроксильная группа (ОН), эта группа увеличивает вероятность гидролиза молекулы РНК, то есть уменьшает ее стабильность. С2'-ОН группа делает РНК конформационно пластичной, а также обеспечивает способность образовывать дополнительные водородные связи с ионами металлов. Это может быть ион Na в комплексе с хлоридом. При взаимодействии РНК с солью NaCl она связывается с ионом, образуя водородные связи, что делает ее стабильной молекулой. Благодаря такому механизму стабилизирующие растворы хлорида натрия часто используют для сохранения молекулы РНК.

Гепарин – один из разновидностей стабилизаторов. Он препятствует свертыванию крови, также является ингибитором нуклеаз, к которым относятся РНКазы. С помощью действия гепарина можно заблокировать рибонуклеазы, функция которых заключается в расщеплении мРНК. Также известно, что гепарин является ингибитором ПЦР-РВ. Для этого существует инактиватор гепарина – протамин сульфат, который образует с ним нерастворимый комплекс.

Также стабилизатором биологических макромолекул является антикоагулянт ЭДТА (соль этилендиаминтетрауксусной кислоты). Она связывает ионы кальция и блокирует каскад свертывания. За счет чего эритроциты, лейкоциты и тромбоциты остаются стабильными клетками в крови до 24 часов. Хелатирующий агент предотвращает воздействие на нуклеиновые кислоты клеточных нуклеаз, так как связывает необходимое для их работы катионы  $Mg^{2+}$ .

### **1.5 Сухие пятна крови**

Технология сухих пятен крови (СПК) давно известна и используется с середины XXв [18]. Так в 1960 году учёный Роберт Гатри смог определить содержание фенилаланина, который является маркёром заболевания фенилкетонурии, в сухом образце крови на фильтровальной бумаге. Благодаря этому методу Гатри смогу в течении 2-х лет определить около 40 случаев заболеваний среди новорождённых детей. В конечном итоге, технологию СПК внедрили в медицину, как метод скрининга различных заболеваний [19]. На данный момент СПК используются для доклинических испытаний лекарств, токсикокинетических, фармакинетических, для клинической фармакологии и даже для судебной и допинговой и экологической экспертизах [20,21].

Преимущества технологии СПК по сравнению с традиционным методом сбора цельной крови состоит в следующем. Во-первых, максимальный объём крови для диагностики заболеваний составляет 120 мкл, а при выделении нуклеиновых кислот, в частности РНК, используется 3,5 мл крови, что говорит о сильной разнице между объемами. Это позволяет с успехом использовать СПК, потому что данное количество крови можно получить при отборе из пальца. Во-вторых, забор и транспортировка цельной крови требует особых условий хранения. Жидкие биообразцы крови необходимо хранить в холоде, также при транспортировке требуется соблюдать нормы холодовой цепи. Сухие образцы не требуют соблюдения норм температурного режима, что позволяет перевозить и хранить их при комнатной температуре [22]. Однако в

исследованиях показано, что возможно денатурация и воздействие нуклеаз на биологические макромолекулы в образцах СПК при повышенной влажности от 75% и выше, а также при высоких температурах (от +30° С) хранения [23]. В-третьих, при транспортировке сухих биообразцов снижается риск заражения, нежели при транспортировке цельной крови. В-четвертых, сухие пятна крови проще утилизировать, чем жидкие. В-пятых, технология СПК позволяет пациентам совершить самостоятельный сбор крови на бумажные носители. Это дает возможность маломобильным или пожилым людям не выезжать в больницы для сдачи крови, а также не требует специальных навыков работы с комплектом отбора. Пациенты самостоятельно могут отправить свои образцы по почте, где расходы будут намного меньше, чем при транспортировке жидких биообразцов.

Все данные преимущества показывают отличную альтернативу традиционному методу молекулярно-диагностического анализа жидкой венозной крови или сыворотки. На данный момент лаборатории используют технологию СПК не только для забора крови, а также и других биологических жидкостей, таких как плазма, слюна, синовиальная жидкость и даже моча [24].

В России, к сожалению, использование технологии СПК не так развита, в сравнении с другими странами. По результатам наукометрической базы данных Scopus в период с 2000-2019 год количество публикаций по тематике технологии сухих пятен крови по всей России в десятки раз меньше (рис. 1), чем в других развитых странах. Это говорит о том, что технология СПК не является актуальной темой сохранения и использования биологического материала.



Рисунок 1. Количество публикаций по тематике СПК с 2000 по 2017 год по данным Scopus [10]

Принцип технологии СПК заключается в следующем. На специальную впитывающую мембрану наносят капельно биологическую жидкость с последующим высушиванием пробы. Впитывающая мембрана представляет собой целлюлозную карточку, на которой обозначены круглые зоны нанесения образца (рис. 2).



Рисунок 2. Один из вариантов карточки для отбора крови Whatman 903

Подготовка к сбору образца традиционная. Для начала необходимо соблюдать правила стерильности, а именно протирать место прокола спиртовыми салфетками. Также используются одноразовые иглы-скарификаторы и перчатки. Для обеспечения прилива крови необходимо растереть зону прокола. Сбор крови у новорожденных и взрослых отличается.

Как правило, у новорожденных отбирают из пятки, у взрослых – из пальца. По одной капле наносят на одну окружность. Одна окружность впитывающей мембраны может содержать в себе биологического образца объемом примерно 60мкл. После нанесения необходимого количества крови на карточку ее высушивают в течение 2-х часов при комнатной температуре. Далее СПК запечатываются в конверт, чтобы изолировать мембрану и образцы от внешних факторов для предотвращения контаминации.

Карточки можно использовать как универсальный метод хранения и транспортировки образцов. Анализируемый биологический материал можно наносить на впитывающую мембрану с помощью полуавтоматического дозатора.

При проведении диагностического анализа вырезают круг с карточки, на котором нанесен биологический образец. Для этого используют специальный медицинский дырокол (панчер). Данные вырезанные образцы подвергаются различным методикам выделения биологических макромолекул. Методики зависят как от самого анализируемого вещества, так и от задачи исследования [25].

**Изъято с 14 по 26 страницу в связи с авторскими правами.**

## **ВЫВОДЫ**

В ходе проведенных работ были получены следующие результаты:

1. Стабилизирующий раствор NaCl, связываясь с молекулой РНК, позволяет предотвратить ее деградацию за счет физико-химических свойств соли и увеличивает выход РНК в 15 раз.
2. При использовании метода DOP-PCR для неспецифического увеличения концентрации РНК было получено увеличение молекул в несколько миллионов раз.
3. Метод выделения РНК из сухих пятен крови с последующим амплификацией молекул с помощью метода ПЦР с вырожденными праймерами можно считать хорошим конкурентом по отношению к традиционному методу выделения анализа РНК из цельной крови с использованием ПЦР-РВ качестве экономически выгодного и простого способа анализа.

## **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

РНК – рибонуклеиновая кислота

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

тРНК – транспортная рибонуклеиновая кислота

рРНК – рибосомальная рибонуклеиновая кислота

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

кДНК – комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота

ПЦР-РТ – полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

DOP-PCR - degenerate oligonucleotide-primed PCR

СПК – сухие пятна крови



## СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Рудченко, М. Н. Перспективы применения самособирающихся структур на основе нуклеиновых кислот / М.Н. Рудченко, А.А. Замятнин (мл.) // Биохимия. – 2015. – Т.80, вып.4. – С. 461–471.
2. Juang D. S. et al. Centrifugation-assisted immiscible fluid filtration for dual-bioanalyte extraction // Analytical chemistry. – 2019. – Т. 91. – №. 18. – С. 11848-11855.
3. Copeland, W. C. Mitochondrial DNA Methods and Protocols / W. C. Copeland // MMB. -2002. V. 197. -P. 199-212.
4. Chachaty, E. Isolating Chromosomal DNA from Bacteria / E. Chachaty, P. Saulnier. // The Nucleic Acid Protocols Handbook, Springer. -2000. -P. 29-32
5. Perry, D. Isolation of DNA and RNA / D. Perry, J. David // Methods in Molecular Medicine. -2001. -V. 31. -P. 25-30
6. Glisin V., Crkvenjakov R., Byus C. Ribonucleic acid isolated by cesium chloride centrifugation //Biochemistry. – 1974. – Т. 13. – №. 12. – С. 2633-2637.
7. Антонова, О. С. Эффективные методы выделения нуклеиновых кислот для проведения анализов в молекулярной биологии / О. С. Антонова, Н.

- A. Корнева, Ю. В. Белов, В. Е. Курочкин // Научное приборостроение. - 2010. -Т. 20, -№ 1. -С. 3-9.
8. Boom R., Sol C.J., Salimans M.M., et al. Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids // J.Clin.Microbiol. 1990. V. 28. P.495–503.
  9. Ghahari S., Ghahari S., Nematzadeh G. A. Magnetic nano fluids for isolation of genomic DNA and total RNA from various prokaryote and eukaryote cells //Journal of Chromatography B. – 2018. – Т. 1102. – С. 125-134.
  10. Guthrie R., Ada S. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants // *Pediatr.* 32. 1963. Vol. 32, No 3. P. 338–343.
  11. Eberhardt E. et al. Comparative evaluation of nucleic acid stabilizing reagents for RNA- and DNA-based Leishmania detection in blood as proxy for visceral burdens // *Journal of microbiological methods.* – 2020. – Т. 173. – С. 105935.
  12. Meesters R.J., Hooff G.P. State-of-the-art dried blood spot analysis: an overview of recent advances and future trends // *Bioanalysis.* 2013. Vol. 5, No 17. P. 2187–2208.
  13. Demirev P.A. Dried blood spots: analysis and applications // *Anal Chem.* 2013. Vol. 85, No 2. P. 779–789.
  4. Sharma A., Jaiswal S., Shukla M., Lal J. Dried blood spots: concepts, present status, and future perspectives in bioanalysis // *Drug Test. Anal.* 2014. Vol. 6, No 5. P. 399–414.
  14. Sharma A., Jaiswal S., Shukla M., Lal J. Dried blood spots: concepts, present status, and future perspectives in bioanalysis // *Drug Test. Anal.* 2014. Vol. 6, No 5. P. 399–414.
  15. Bowen C.L., Volpatti J., Cades J., Licea-Perez H., Evans C.A. Evaluation of glucuronide metabolite stability in dried blood spots. // *Bioanalysis.* 2012. Vol. 4, No 23. P. 2823–2832.
  16. Heneghan N. et al. The effect of environmental conditions on the rate of RNA degradation in dried blood stains // *Forensic Science International: Genetics.* – 2021. – Т. 51. – С. 102456.
  17. Li W., Lee M.S. Dried blood spots: applications and techniques. Wiley

- Series on Pharmaceutical Science and Biotechnology: Practices, Applications and Methods, 2014. 363 p.
18. Johnson C.J., Christianson C.D., Sheaff C.N., Laine D.F., Zimmer J.S., Needham S.R. Use of conventional bioanalytical devices to automate DBS extractions in liquid-handling dispensing tips // *Bioanalysis*. 2011. Vol. 3, No 20. P. 2303–2310.
  19. Морозова, В. Т. Хронические лейкозы / В. Т. Морозова // *Клиническая лабораторная диагностика*. – 2000. – Т. 12-С. 25- 32.
  20. Коцкая, Н. Н. Медико-статистические характеристики и комплексная оценка результатов лечения острых лимфобластных лейкозов у детей / Н. Н. Коцкая // *Сибирское медицинское обозрение*. – 2011. Т. 72. – С. 9-13.
  21. Рулина, А. В. Активированные лейкозные онкогены AML1-ETO и С-KIT: роль в развитии острого миелоидного лейкоза и современные подходы к их ингибированию / А. В. Рулина, П.В. Спирин, В.С. Прасолов // *Успехи биологической химии*. -2010. – Т.50. – С. 349-386.
  22. Четвертина, Е. В. Нанокolonии и диагностика онкологических заболеваний, ассоциированных с хромосомными транслокациями / Е. В. Четвертина, А. Б. Четвертин // *Успехи биологической химии*. – 2010. – Т. 50. – С. 387-446.
  23. Воробьев А. И. Руководство по гематологии. / А. И. Воробьев, Ю. Н. Андреев, З.С. Баркаган // Издательство “Ньюдиамед”. – 2005. –Т. 5. – С. 413.
  24. Дагбашян, С. С. Мониторинг минимальной остаточной болезни в гематологической клинике. / С. С. Дагбашян, Л. С. Саакян, А. Г. Захарян // *Научно –практический журнал Кровь*. -2013. – С. 44-52.
  25. Campana, D. Role of minimal residual disease monitoring in adult and pediatric acute lymphoblastic leukemia / D. Campana // *Hematol. Oncol. Clin. North. Am.* – 2001. – Т. 23. – 1083 – 1098 p.

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

В.А. Кратасюк В.А. Кратасюк

« 20 » июня 2021 г.

**БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**

**06.03.01 Биология**

**Разработка метода сбора и сохранения РНК в сухих пятнах крови человека**

Руководитель

С. В. Столяр 21.06.21  
подпись, дата

д-р ф.м.н. С. В. Столяр

Научный консультант

И. А. Ольховский 21.06.21  
подпись, дата

к.м.н. И.А. Ольховский

Выпускник

Е. А. Плечко 21.06.21  
подпись, дата

Е. А. Плечко

Красноярск 2021