

Эффективность синтеза кДНК (обратная транскрипция) с использованием РНК, выделенной на силикатных сорбентах.

Алексей Жигулин, ООО «Силекс», info@sileks.com

28 марта 2021 года

Выделение нуклеиновых кислот, в частности, РНК на силикатных сорбентах, в том числе, на [магнитных частицах, покрытых силикой](#) (оксидом кремния), имеет свои особенности.

При выделении нуклеиновых кислот, как ДНК, так и РНК, на силикатных сорбентах конечный препарат всегда содержит определенное количество примесей. К основным примесям относятся:

- хаотропные и хелатирующие компоненты используемых буферов,
- ионные и неионные детергенты,
- органические растворители,
- белки и олигопептиды,
- ионы солей.

Для дальнейшей работы с ДНК эти примеси хотя и имеют значение, но в большинстве случаев не являются критическими. При работе с РНК примеси мешают в значительно большей степени. В первую очередь негативное влияние примесей проявляется в [синтезе первой цепи кДНК](#) (обратной транскрипции).

Дело в том, что эффективность обратной транскрипции зависит от нескольких факторов:

1. эффективный отжиг праймера на матрице РНК
2. отсутствие в структуре РНК шпилек
3. отсутствие белков, олигопептидов, других компонентов, прочно связанных с матрицей
4. компонентами, влияющие на эффективность обратной транскриптазы

Многие производители наборов для выделения РНК и мРНК из сложных образцов ([FFPE](#), [плазма и сыворотка](#), [моча](#)) рекомендуют брать весь выделенный материал в реакцию синтеза первой цепи кДНК. Мы проверили, как влияет количество вносимого материала на эффективность обратной транскрипции.

Работа выполнялась в лаборатории иммунологии, онкоцитологии и клеточных технологий в онкологии ФГБУ «РНЦРР» Минздрава России сотрудниками лаборатории Захаренко Маргаритой Владимировной и Киселевой Яной Юрьевной ([полный текст статьи](#)).

В исследовании проводилось выделение РНК из парафинизированных образцов ткани фиксированных в формалине набором «[Выделение ДНК/РНК из парафинизированных образцов, фиксированных в формалине \(FFPE\), на магнитных частицах SileksMagNA](#)», ООО "Силекс", Россия, кат. номер KIRFFPE0100.

Депарафинизацию образцов проводили с использованием ксилола. В работу брали 1 срез толщиной 10 мкм, который дважды обрабатывали ксилолом, с последующей отмывкой 96%-ым этанолом и гидратацией образца 90%-ым и 70%-ым этанолом согласно протоколу производителя. Выделение ДНК/РНК проводили в соответствии с протоколом производителя. ДНК/РНК, содержащуюся в образце и сорбированную на магнитных частицах, элюировали 30 мкл буфера Elution. К полученному элюату добавляли 3 мкл RNA Protector в соотношении 10:1 (конечный объем элюата : RNA Protector).

Оценка качества РНК

Оценку качества экстрагированной ДНК/РНК проводили, используя микрокапиллярный электрофорез на чипе (Bioanalyzer 2100, Agilent Technologies, Mississauga, Онтарио, Канада). Степень деградации/фрагментации ДНК/РНК оценивали, определяя индекс целостности РНК (RIN) и соотношение (%) площади целевого диапазона фрагментов к соотношению тотальной ДНК/РНК. Концентрацию полученной тотальной ДНК/РНК измеряли при помощи флуориметра Qubit 2,0 (Life Technologies).

Постановка реакции обратной транскрипции (ОТ) и количественной ПЦР (полимеразной цепной реакции)

Проведение ОТ и ПЦР осуществляли в два этапа. Реакцию ОТ проводили непосредственно после выделения ДНК/РНК. Количество элюата, использованного для постановки ОТ, варьировало и детально описано в результатах исследования. К каждому выбранному объему элюата добавляли DEPC-обработанную воду до конечного объема 17 мкл, который использовали в реакции синтеза кДНК. Для постановки реакций ОТ и ПЦР использовали ген-специфичные праймеры, наборы реагентов, протоколы и оборудование ЗАО «НПФ ДНК-Технология» (Россия). Реакционную смесь инкубировали при 40°C в течение 30 минут, с последующей инактивацией обратной транскриптазы при 95°C в течение 5 минут. Полученную таким образом кДНК сразу использовали для постановки ПЦР в реальном времени.

Уровень экспрессии генов определяли методом количественной ПЦР. Оценивали экспрессию 11 функциональных генов (MYC, CCNB1, CCND1, MYBL2, PTEN, P16INK4A, BAG1, PGR, HER2, CD68, GRB7). Оценку качества и количества РНК проводили с использованием нормализации по генам «домашнего хозяйства» (housekeeping genes) GUSB (бета-глюкуронидаза) и B2M (бета-2-микроглобулин). ПЦР в реальном времени выполняли в 384-луночном формате на амплификаторе DT-Prime5 «ДНК-Технология». Специфические праймеры, зонды и смеси для амплификации были разработаны компанией «ДНК-Технология» с учетом особенности сильной фрагментации РНК в FFPE-образцах. Используемые праймеры и зонды специфически взаимодействуют с участками кДНК на стыке экзонов. Размер конечного ампликона находился в пределах 100 п.н.. Амплификацию проводили в режиме «реального времени» в объеме 12 мкл по следующей программе: 15 циклов - 80°C 5 сек, 94°C 5 сек.; 1 цикл - 94°C 5 мин; 50 циклов - 94°C 10 сек, 64°C 20 сек. Измерение уровня флуоресценции проводили на каждом цикле при температуре 64°C. В каждой постановке ПЦР использовали отрицательный контроль. Для оценки отсутствия контаминации использовали реакционную смесь без матрицы. На образцах, прошедших все стадии выделения РНК без добавления фермента для обратной транскрипции, оценивали возможное наличие амплификации примесей геномной ДНК. В контрольных образцах после 50 циклов продукт амплификации отсутствовал. Реакцию амплификации проводили в дубликатах, из которых в расчет брали среднее значение точки пересечения (crossing point, C_p).

Статистический анализ

Математическую обработку полученных данных осуществляли в программе Statistica 10,0 (USA). Для расчета коэффициента корреляции использовали квадратную матрицу r -значений, отображенную в виде карты цветов корреляций. При расчете коэффициента корреляции для генов, экспрессию которых определяли одновременно в парах образцов, выделенных разными наборами, наличие корреляции признавалось при значении абсолютной величины более 0,5.

Зависимость C_p от количества элюата, взятого в обратную транскрипцию

Для оценки влияния ингибирующих примесей в элюате на ход реакции ОТ мы использовали различное количество элюата: 2,5 мкл, 5 мкл, 10 мкл и 15 мкл, полученного при выделении ДНК/РНК набором Силекс. Сравнение C_p для различных объемов элюата, взятого в ОТ, выявило, что оптимальным является объем 2.5 мкл (см. рисунок 1). При использовании больших объемов элюата, результаты амплификации показывают, что выявить низкоэкспрессируемые гены либо не удастся, либо они выявляются на более поздних циклах. Среднее значение C_p снижается для объема 5 мкл на 1,35 цикла, а для 15 мкл на 6,33 цикла.

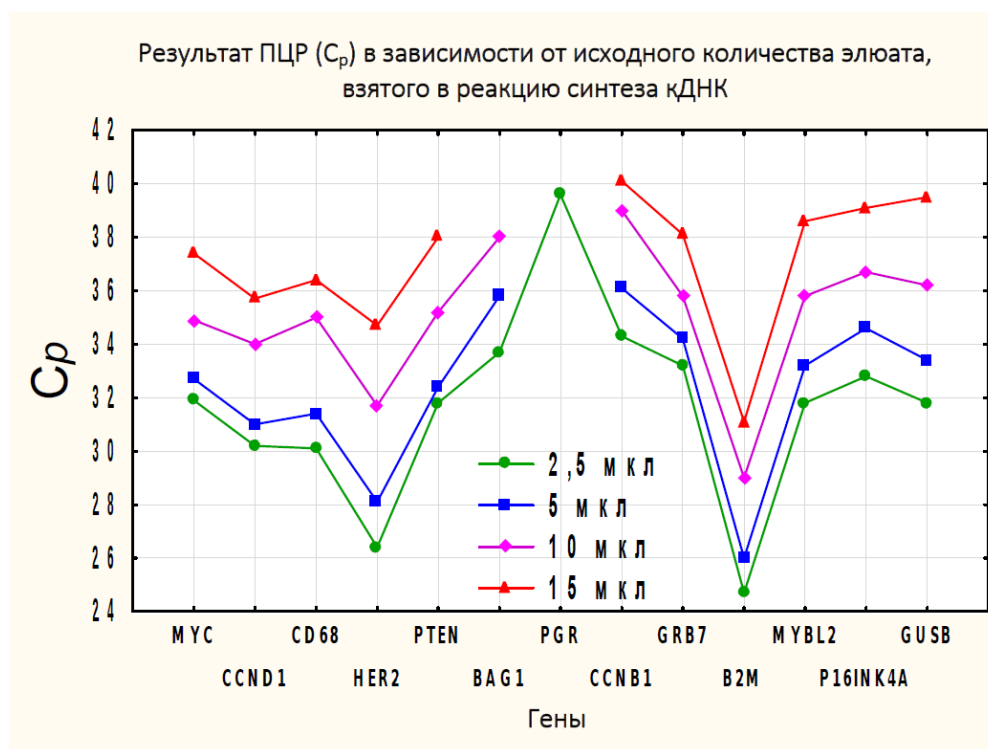


Рисунок 1. Зависимость эффективности ПЦР от количества элюата, взятого в ОТ.

Исходя из результатов поведенного эксперимента мы рекомендуем:

1. при использовании силикатных сорбентов, в том числе силикатных магнитных частиц от любых производителей, в обязательном порядке проверять влияние количества элюата на эффективность проведения реакции обратной транскрипции (ОТ, синтеза первой цепи кДНК). Делать проверку нужно всегда, вне зависимости от рекомендаций производителя набора.
2. при работе с [наборами для выделения ДНК/РНК](#) фирмы «Силекс», мы рекомендуем в реакцию синтеза первой цепи вносить полученный элюат в количестве не более $1/8$ объема от конечного объема реакционной смеси. Оптимальное количество, вносимое в реакцию - $1/10$ объема. Например, при постановке реакции синтеза первой цепи в объеме 25 мкл рекомендуемое количество элюата - 3 мкл. Использование большего количества элюата может приводить к ингибированию реакции.