

Сравнение эффективности выделения РНК из парафинизированных образцов наборами фирм Силекс и Qiagen

Захаренко Маргарита Владимировна,

младший научный сотрудник лаборатории иммунологии, онкоцитологии и клеточных технологий в онкологии ФГБУ «РНЦРР» Минздрава России

тел.: +7-926-721-43-91, эл.почта: zak-margarita@mail.ru

Киселева Яна Юрьевна,

кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории иммунологии, онкоцитологии и клеточных технологий в онкологии ФГБУ «РНЦРР» Минздрава России

тел.: +7-903-672-8541, эл.почта: yana.kiseleva@gmail.com

В последние годы существенно возросла потребность в анализе экспрессии генов в большом числе образцов, которые хранятся в больницах и научно-исследовательских институтах в виде фиксированных в формалине залитых в парафин тканей (FFPE – formalin fixed paraffin embedded). Поскольку было накоплено большое количество полученных ранее данных по заболеваниям, возможность выделять и проводить анализ РНК из образцов, хранящихся в виде парафинизированных блоков, позволяет проводить ретроспективные исследования, что в значительной степени содействует разработке перспективного лечения и профилактики заболеваний.

Отвечая потребности исследователей, широкое распространение получили различные наборы и методики экстрагирования РНК из FFPE-образцов. Однако, анализ экспрессии генов с использованием РНК, экстрагированной из FFPE-образцов, в которых наблюдается обширная деградация и/или фрагментация, или перекрестное связывание, добавление и/или модификация, довольно затруднителен из-за наличия большого количества потенциальных ингибиторов. Так как образцы фиксированных тканей обычно хранятся при комнатной температуре, РНК подвергается дополнительной деградации. Совокупное влияние всех этих факторов сказывается на эффективности анализа выделяемой РНК методами полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Влияние ингибирующих примесей особенно сильно проявляется при проведении реакции синтеза первой цепи ДНК. Очистка РНК от ингибиторов позволяет существенно повысить эффективность ПЦР как конечной стадии анализа.

В нашем исследовании мы оценивали эффективность выделения РНК из парафинизированных образцов ткани фиксированных в формалине наборами фирмы ООО "Силекс" (Россия) и фирмы Qiagen GmbH (Германия).

Для определения качества РНК, выделенной из FFPE-образцов, использовали индекс целостности (RIN) с помощью микрокапиллярного электрофореза Agilent Technologies (Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S. et al., The RIN: an RNA Integrity number for assigning integrity values to RNA measurements BMC Molecular Biol (2006) 7: 3. doi:10.1186/1471-2199-7-3), а также проводили измерение концентрации РНК. Качество выделенной РНК проверяли по анализу уровня экспрессии 11 функциональных генов и 2 генов «домашнего хозяйства» по значению точки пересечения (crossing point, Cp). В работе были использованы протоколы выделения ДНК/РНК для FFPE-образцов на магнитных частицах (ООО "Силекс", Россия) и колонках мини-спин (Qiagen GmbH, Германия). Для оценки сопоставимости методик был проведен корреляционный анализ исследуемых генов.

Материалы и методы

Исследование проведено на парафинизированных образцах рака молочной железы (РМЖ) фиксированных в формалине. Срезы готовили непосредственно перед выделением.

Выделение ДНК/РНК набором фирмы Силекс

Выделение ДНК/РНК на магнитных частицах SileksMagNA проводили с использованием набора "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. Для этого в работу брали 1 срез толщиной 10 мкм, который дважды обрабатывали ксилолом, с последующей отмывкой 96% этанолом и гидратацией образца 90% и 70% этанолом согласно протоколу, рекомендованному производителем. Выделение ДНК/РНК проводили в соответствии с инструкцией производителя.

Для оценки влияния длительного хранения ДНК/РНК, иммобилизованных на магнитных частицах в буфере FinalWash, на сохранность РНК, образцы четырех пациентов хранили при 4°C в течение двух месяцев. ДНК/РНК, содержащуюся в образце и сорбированную на магнитных частицах, элюировали буфером Elution в 30 мкл DEPC-обработанной воды. К полученному элюату добавляли RNAProtector в соотношении 10:1 (конечный объем элюата : RNA Protector).

Выделение ДНК/РНК набором QIAGEN

Выделение ДНК/РНК на сорбирующих колонках с использованием набора "RNeasy FFPE Kit" (Qiagen GmbH, Германия, кат. номер 73504) проводили из тех же образцов по протоколу, рекомендованному производителем. Согласно рекомендации в работу брали 2 среза толщиной 10 мкм. Из протокола был исключен этап обработки ДНКазой I, так как использовались праймеры, специфические только для кДНК. Депарафинизацию проводили с использованием ксилола согласно протоколу Qiagen. ДНК/РНК элюировали в 30 мкл DEPC-обработанной воды.

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

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» 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 реакцию смеси 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, Cp).

Статистический анализ

Математическую обработку полученных данных осуществляли в программе Statistica 10,0 (USA). Для расчета коэффициента корреляции использовали квадратную матрицу t -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.

Результаты

Сравнительный анализ выделения РНК для определения экспрессии генов в тканях FFPE проводили в несколько этапов. На каждом этапе, изложенном ниже, образцы РНК сравнивали в парах. При этом РНК параллельно выделяли наборами компаний Силекс и Qiagen из одинаковых FFPE-образцов.

В процессе сравнительного анализа выделения мы изучили влияние разведения конечного элюата образцов РНК и использования разных объемов, взятых в ОТ, на конечную эффективность ПЦР. Учитывая полученные результаты, нами были проанализированы и оптимизированы этапы пробоподготовки для набора фирмы Силекс и получены стабильно эффективные результаты. На заключительном этапе мы оценили сопоставимость наборов Qiagen и Силекс, используя корреляционный анализ.

Оценка качества экстрагированной РНК с использованием микрокапиллярного электрофореза на чипе.

Качество выделенной ДНК/РНК анализировали с использованием микрокапиллярного электрофореза. Анализ проводили в соответствии с протоколом компании производителя Agilent Technologies. Было исследовано 8 образцов. В реакции брали 1 мкл из 30 мкл элюата. Среднее значение индекса целостности РНК (RIN) для образцов РНК, выделенных с использованием набора фирмы Силекс соответствовало 1,39; для набора фирмы Qiagen - 1,41. Среднее значение соотношения (%) площади целевого диапазона фрагментов к соотношению тотальной РНК составило для образцов РНК 62,66 (Силекс) и 53,82 (Qiagen). Мы наблюдали отсутствие молекул 18S и 28S в исследуемых образцах. При этом получили стабильные для проведения анализа результаты для тех же образцов посредством ПЦР после ОТ. Таким образом, мы предполагаем, что определение качества сильно деградированной в FFPE образцах РНК более надежно проводить посредством метода ПЦР с предварительной ОТ.

Таблица 1. Оценка качества экстрагированной РНК

		Силекс	Qiagen
Экспрессия генов домашнего хозяйства, C _p (среднее значение)	B2M	27,7	27,1
	GUSB	34,3	33,3
Индекс целостности РНК (RIN)		1,39	1,41
Соотношение (%) площади целевого диапазона фрагментов к соотношению тотальной РНК (RNA Area)		62,66	53,82

Сравнение эффективности наборов Силекс и Qiagen при взятии в реакцию обратной транскрипции объемов, рекомендованных производителем.

Мы сравнили эффективность набора Силекс при взятии в реакцию обратной транскрипции 3 мкл, что соответствует 1/10 объема элюата для набора Силекс (в соответствии с рекомендацией протокола Силекс), по сравнению с набором Qiagen. По рекомендациям Qiagen в реакцию обратной транскрипции брали 17 мкл полученного элюата. Эксперимент был проведен на образцах 8 пациентов. В реакцию ПЦР были взяты одинаковые объемы, полученные в реакции ОТ.

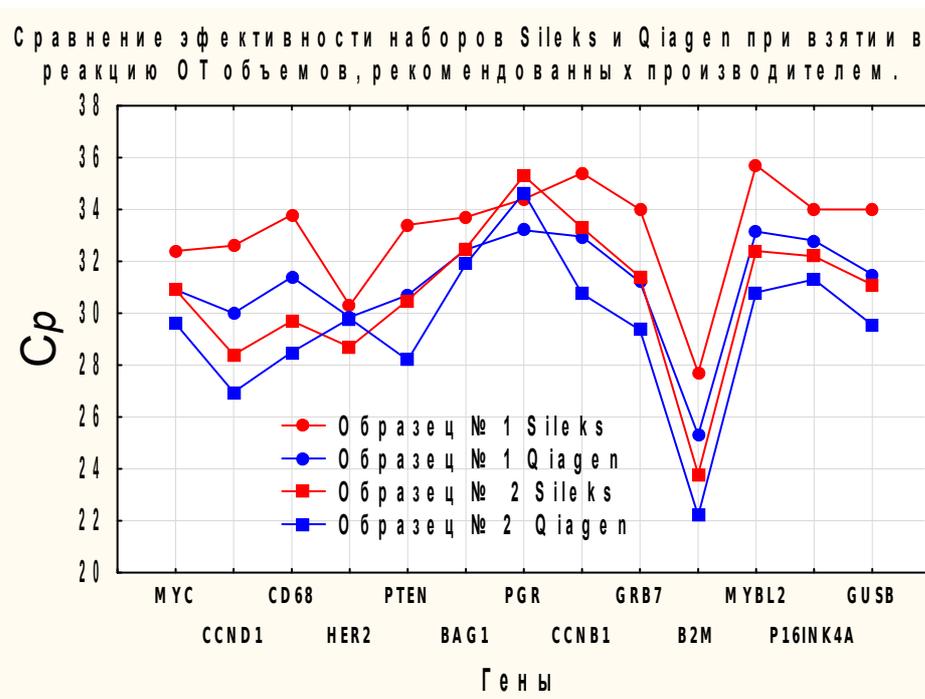


Рис. 1 Сравнение эффективности наборов Силекс и Qiagen по результатам ПЦР.

Сравнение результатов ПЦР показывает, что значения C_p , полученные в реакции ПЦР для исследуемых генов, сравнимы для двух наборов.

Необходимо учесть, что для набора Qiagen в ОТ было взято в 3,5 раза больше элюата.

Оптимизация использования элюата ДНК/РНК полученного набором фирмы Силекс. 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: 2,5мкл, 5 мкл, 10 мкл, 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. рис. 3). 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.

На данном этапе работы было определена следующая оптимальная процедура подготовки элюата для проведения ОТ:

1. магнитные частицы после суспендирования и отмывки в 300 мкл буфера FinalWash сушили в соответствии с рекомендациями производителя,
2. добавляли 30 мкл буфера Elution,
3. после сбора элюата брали 2,5 мкл элюата, доводили DEPC-обработанной водой до 17 мкл,
4. добавляли компоненты для проведения ОТ.

Данная процедура позволяет получить стабильные результаты и использовалась для всех последующих этапов исследования.

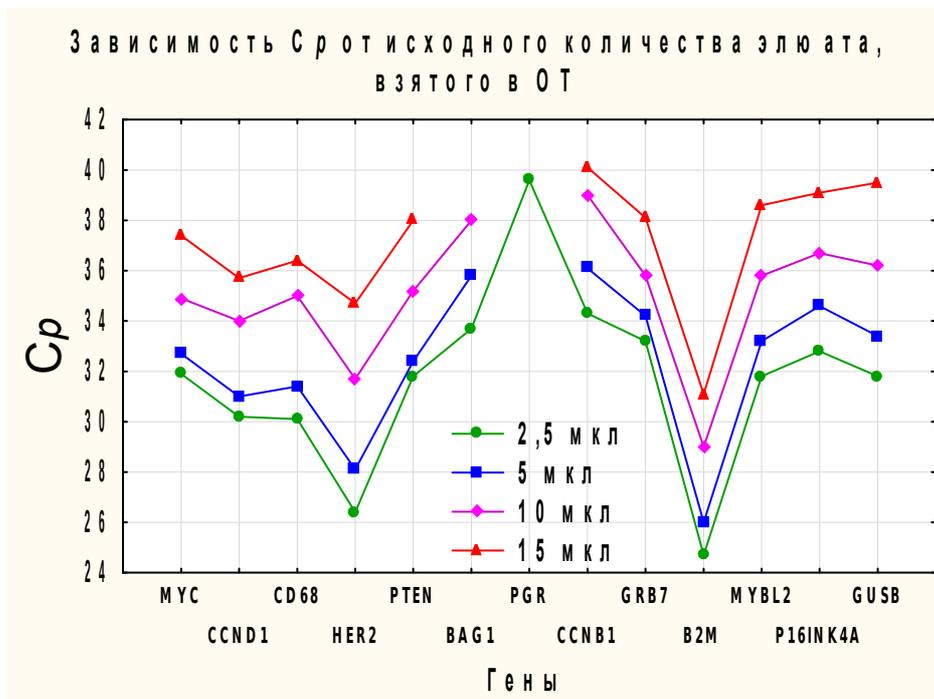
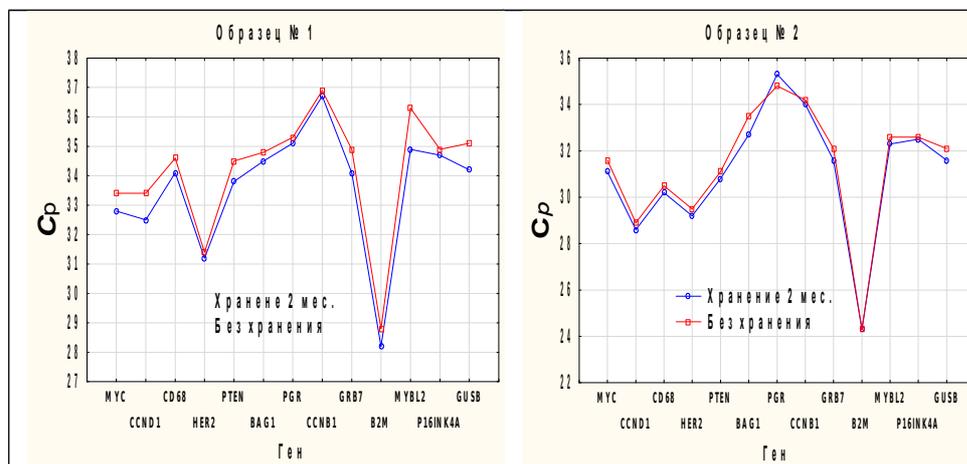


Рис. 3. Зависимость эффективности ПЦР от количества элюата, взятого в ОТ.

Оценка влияния долгосрочного хранения ДНК/РНК в буфере FinalWash (Силекс)

Мы оценили влияние долгосрочного хранения на сохранность ДНК/РНК, сорбированных на магнитных частицах в буфере FinalWash, в образцах четырех пациентов (см. рис 4). Для этого РНК образцов, хранившихся в буфере FinalWash при 4°C в течение 2 месяцев, элюировали согласно протоколу производителя. Для синтеза кДНК и оценки экспрессии генов использовали оптимальный, согласно вышеприведенным результатам, объем элюата (2.5мкл). Исследование показало, что разница между C_p для образцов без хранения и после двухмесячного хранения составила $0,5 \pm 0,18$ цикла и статистически недостоверна (t-тест).



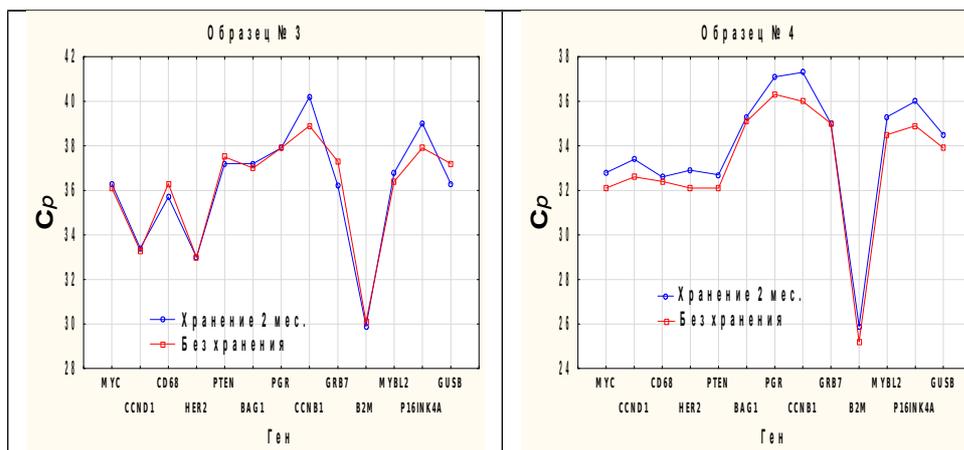


Рис. 4. Влияние долгосрочного хранения на сохранность ДНК/РНК в буфере FinalWash.

Резервное хранение и использование части образца.

Определение оптимального объема суспензии магнитных частиц с сорбированными ДНК/РНК в буфере FinalWash при использовании части образца

ДНК/РНК в связанном на частицах виде в буфере FinalWash могут длительно храниться, что дает возможность создания банка ДНК/РНК.

При хранении образца в буфере FinalWash возникает необходимость определения оптимального количества магнитных с сорбированными ДНК/РНК, которые можно использовать для получения репрезентативного результата.

Нами были выбраны следующие 3 объема: 20 мкл; 30 мкл; 50 мкл, взятых из 300 мкл суспензии магнитных частиц в буфере FinalWash.

Время сушки перед элюированием из-за уменьшенного объема магнитных частиц составило 1 минуту на воздухе. Было исследовано 4 образца. Частицы элюировали в 30 мкл буфера Elution (Силекс), из которых в ОТ было взято (соблюдая оптимальное соотношение объемов) 17 мкл элюата без разведения DEPC-обработанной водой. Реакцию ОТ и ПЦР ставили сразу после выделения.

Результаты показали зависимость эффективности ПЦР от объема магнитных частиц в буфере FinalWash, взятых в реакцию. Оптимальные результаты эффективности ПЦР были получены при объемах 30–50 мкл с разницей C_p 0,11±0,42 цикла (см. рис. 5).

Зависимость C_p от объема магнитных частиц, взятых для получения элюата

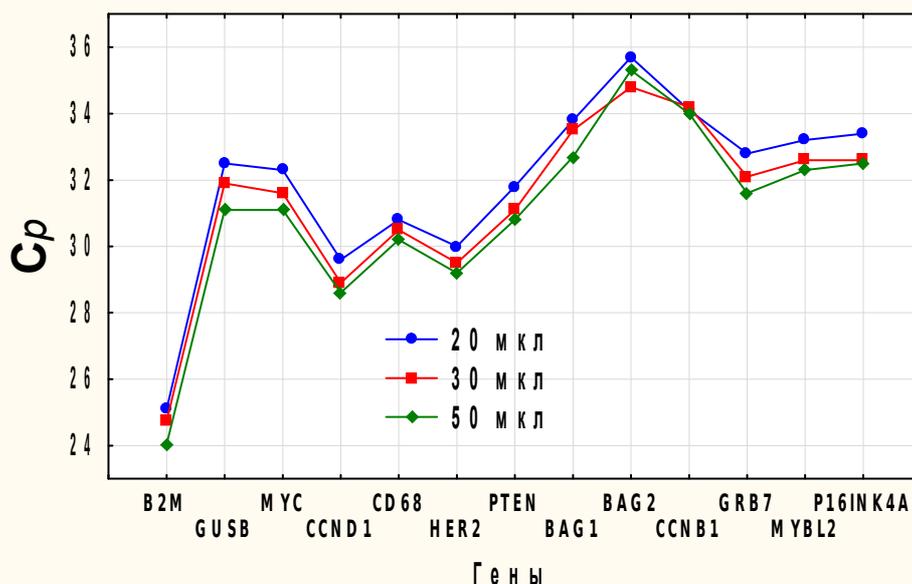


Рис. 5. Эффективность ПЦР в зависимости от количества частиц из суспензии в буфере FinalWash, взятой для получения конечного элюата.

Оценка эффективности ПЦР при использовании набора для дополнительной очистки выделенной ДНК/РНК (Силекс)

Мы оценили эффективность ПЦР при использовании набора дополнительной очистки ДНК/РНК (Силекс) на образцах четырех пациентов. Образцы исследовали в 2 вариантах: с очисткой и без очистки. Для этого образцы ДНК/РНК, сорбированной на магнитных частицах в 300 мкл буфера FinalWash, разделили на 2 объема по 150 мкл. После чего проводили параллельное выделение. Магнитные частицы сушили на воздухе в течение 1 минуты. Одна часть элюата служила контролем, вторую часть элюата подвергали процедуре дополнительной очистки согласно протоколу производителя (Силекс) с последующей элюцией в объеме, равном контролю. Проведенное исследование показало более низкие значения C_T при использовании дополнительного этапа очистки, что соответствует более высокой эффективности ПЦР.

Выводы

Сравнение эффективности наборов фирмы Силекс и Qiagen при следовании протоколам и рекомендациям производителя

Проведенный нами анализ сравнения эффективности выделения РНК из парафинизированных образцов наборами фирм Силекс и Qiagen показал следующее:

1. Набор "Выделение ДНК/РНК из парафинизированных образцов фиксированных в формалине (FFPE) на магнитных частицах SileksMagNA" фирмы ООО "Силекс" сопоставим по эффективности с набором "RNeasy FFPE Kit" фирмы Qiagen GmbH, если выполняются рекомендации производителя (ООО "Силекс").

2. При проведении реакции обратной транскрипции с использованием материала, полученного набором фирмы Силекс, рекомендуется брать элюат в количестве от 1/8 до 1/10 от конечного объема реакционной смеси (в случае, если была элюирована вся сорбированная на частицах ДНК/РНК).

Дополнительным преимуществом набора фирмы Силекс является возможность создания резервного банка выделенных образцов с возможностью использования части образца для анализа.

При этом хранение образцов возможно в течение длительного времени без потери качества выделенного материала.

Работа была проведена в ФГБУ "Российский научный центр Рентгено радиологии" Минздрава России, 117997, г. Москва, ул. Профсоюзная, д. 86.

Научно-исследовательский отдел молекулярной биологии и экспериментальной терапии опухолей.

Лаборатория молекулярной биологии, онкоцитологии и клеточных технологий

Заведующий отделом: д.м.н., профессор, *Боженко Владимир Константинович*.