

Сравнительный анализ эффективности выделения малых некодирующих РНК из клинического материала.

Зарайский Михаил Игоревич

Профессор кафедры медицинской генетики СЗГМУ имени И.И. Мечникова, д.м.н., доцент

Эл.почта: mzaraiski@yandex.ru

В актуальной теме анализа микроРНК существует важный этап, определяющий принципиальную возможность с данным материалом. Таким этапом является выделение микроРНК из интересующих объектов.

Стандартным признанным референтным методом является триазольный метод выделения РНК, включая микроРНК. Тризол — это раствор, который используется для экстракции РНК, ДНК или белков, в соответствии с методикой Хомчинского. Полное название метода — гуанидин тиоцианат-фенол-хлороформная экстракция. Во время гомогенизации ткани тризол одновременно поддерживает целостность РНК и способствует разрушению клеток и их компонентов. Также тризол является торговой маркой фирмы Invitrogen.

Основным недостатком триазольного метода является использование токсичных компонентов типа фенола и длительность процедуры выделения, что препятствует широкому применению этого метода в рутинной клинической диагностике на основе методов анализа микроРНК.

В приводимой ниже работе мы сравнивали выделение нуклеиновых кислот содержащей микроРНК двумя наборами.

Первый набор представлял собой реактив «ExtractRNA» (Евроген, Москва). Реактив представляет собой аналог реактива Тризол. Тотальную РНК выделяли из плазмы крови и мочи согласно прилагаемой к реактиву инструкции с последующим осаждением РНК изопропанолом. Объем исходного образца составлял 300 мкл.

Второй используемый в сравнении набор был набор для бесфенольного выделения на основе магнитных частиц «Выделение микро РНК (бесфенольный метод)» (ООО «Силекс», Москва). Тотальную РНК выделяли из тех же образцов плазмы крови и мочи согласно прилагаемой инструкции. Объем исходного образца составлял 100 мкл.

Образец плазмы стабилизированной ЭДТА получали из периферической крови здорового донора путем центрифугирования 5 минут при 8000 об/мин. Образец мочи получали от крыс стока Wistar с исходной массой тела 280,5±42,7 г.

Проводилось сравнение чувствительности определения присутствующих в образцах следующих микроРНК: микроРНК-21, 23, 27, 195, 210, 320.

Выделенную микроРНК определяли методом реал-тайм полимеразной цепной реакции (ПЦР) после реакции обратной транскрипции.

Реакцию обратной транскрипции и последующую ПЦР проводили на приборе ДТ-Lite («ДНК-Технология», Москва).

Реакцию обратной транскрипции со специфическими праймерами для каждой микроРНК выполняли по технологии StemLoop. В качестве базовых реактивов использовали набор ОТ-1 фирмы «Синтол» (Москва). Каждая реакционная смесь состояла из 5 мкл буфера для обратной транскрипции, 1 мкл специфического праймера в концентрации 1 пмоль, 0,5 мкл фермента обратной транскриптазы фирмы «Синтол» (Москва) и 3 мкл раствора тотальной РНК, полученной в процессе выделения. Температурный профиль реакции: 30 минут при температуре +16 °С, 30 минут при температуре +42 °С, 5 минут при температуре +85 °С, после окончания реакции образцы охлаждали до температуры +4 °С.

Аmplификацию проводили в присутствии интеркалирующего красителя EvaGreen с использованием набора «М-439» («Синтол», Москва). Каждая реакционная смесь состояла из 10 мкл воды, 10 мкл буфера («Синтол», Москва), 0,5 мкл прямого праймера и 0,5 мкл общего обратного праймера в концентрации по 1 пмоль и 4 мкл кДНК, полученной на предыдущем этапе. Температурный профиль реакции: 10 минут при температуре +95 °С и 45 циклов, состоящих из 15 сек при температуре +95 °С и 1 минуте при температуре +60 °С.

Полученные данные сравнения двух наборов представлены в таблицах 1 и 2 для плазмы и мочи, соответственно.

Таблица 1

	Пороговое число циклов, Ct					
	21	23	27	195	210	320
МикроРНК						
ExtractRNA, Евроген	32,3	32,6	35,8	33,4	39,0	31,2
Выделение микро РНК, Силекс	26,9	29,0	28,3	28,0	36,1	27,6
Разница в Ct (Фенол-Силекс)	5,4	3,6	7,5	5,4	2,9	3,6

Чувствительность выявления микроРНК в образцах плазмы крови здорового донора в зависимости от протокола выделения тотальной РНК.

Таблица 2

	Пороговое число циклов, Ct					
	21	23	27	195	210	320
МикроРНК						
ExtractRNA, Евроген	31,8	37,8	38,7	36,5	39,7	36,3
Выделение микро РНК, Силекс	30,3	37,9	38,4	36,0	36,2	34,7
Разница в Ct (Фенол-Силекс)	1,5	-0,1	0,3	0,5	3,5	1,6

Чувствительность выявления микроРНК в образцах мочи крысы в зависимости от протокола выделения тотальной РНК.

18 мая 2024 года