



<https://doi.org/10.24060/2076-3093-2019-9-1-80-86>

Экстракция малых РНК из биологических жидкостей человека для последующего секвенирования нового поколения

Бейлерли Озал Арзуман-оглы — аспирант кафедры урологии с курсом ИДПО, e-mail: obeyleerli@mail.ru, тел.: +79875980003, orcid.org/0000-0002-6149-5460

О.А. Бейлерли, А.Т. Бейлерли, И.Ф. Гареев

Башкирский государственный медицинский университет, Россия, 450008, Уфа, ул. Ленина, 3

Контакты: Бейлерли Озал Арзуман-оглы, e-mail: obeyleerli@mail.ru, тел.: +79875980003

Бейлерли Аферин Тагикзы — клинический ординатор 2-го года обучения кафедры акушерства и гинекологии № 1, e-mail: agamidli@mail.ru, orcid.org/0000-0002-3486-6246

Резюме

Существует ряд вопросов при выборе методик для экспериментов, связанных с секвенированием нового поколения (Next-Generation Sequencing). С одной стороны, во время работы с экстракцией РНК добавленные реагенты и их остатки часто могут ингибировать чувствительные химические вещества, с помощью которых осуществляется последовательный синтез для секвенирования. С другой, обработка данных с применением различного программного обеспечения для анализа результатов также может влиять на результаты секвенирования. Текущая работа будет описывать поэтапно, как готовятся образцы из биологических жидкостей человека для последующего секвенирования малых РНК, в частности некодирующих. Что касается способов экстракции или изоляции РНК, мы обнаружили, что малый выход РНК может быть значительно увеличен, по методу изоляции тотальной РНК и ее фракций, включенных в набор MirVana PARIS Kit от Ambion, при специальном подходе и модификации этапа органической экстракции. По сравнению с другими методиками поставляемые с имеющимися в продаже наборами на момент этой работы требуют только одной органической экстракции. Эта простая, но, как оказалось, весьма полезная модификация позволяет получить доступ к ранее недоступному материалу. Потенциальными преимуществами этой модификации являются более полное профилирование малых РНК, а также более широкий доступ к небольшим объемам образцов, как правило, доступ к биологическим жидкостям человека, которые могут быть приготовлены для секвенирования РНК на платформе Illumina.

Гареев Ильгиз Фанилевич — аспирант кафедры нейрохирургии и медицинской реабилитации с курсом ИДПО, e-mail: ilgiz_gareev@mail.ru, orcid.org/0000-0002-4965-0835

Ключевые слова: экстракция РНК, малые РНК, секвенирование нового поколения, цереброспинальная жидкость, биологические жидкости

Для цитирования: Бейлерли О.А., Бейлерли А.Т., Гареев И.Ф. Экстракция малых РНК из биологических жидкостей человека для последующего секвенирования нового поколения. Креативная хирургия и онкология. 2019;9(1):80–86. <https://doi.org/10.24060/2076-3093-2019-9-1-80-86>

Extracting Small RNAs from Human Biological Fluids for Subsequent Next-Generation Sequencing

Ozal A. Beylerli, Aferin T. Beylerli, Il'giz F. Gareev

Bashkir State Medical University, 3 Lenin str., Ufa, 450008, Russian Federation

Contacts: Beylerli Ozal Arzuman-ogly, e-mail: obeylerli@mail.ru, tel.: +79875980003

Summary

A number of questions arise when choosing methods for experiments related to next-generation sequencing. On the one hand, while working with RNA extraction, added reagents and their residues can often inhibit sensitive chemicals with which the sequential synthesis is carried out for the sequencing. On the other hand, processing the same data using different software for the analysis can also impact on the sequencing results. This paper will present the step by step procedure for the preparation of samples taken from human biological fluids for subsequent sequencing of small RNAs, small noncoding RNAs in particular. Regarding the methods of extraction or isolation of RNAs, we found that low RNA yield can be improved significantly by following the isolation method for total RNA and its fractions included in Ambion's MirVana PARIS kit, but only if using a special approach and modifying the organic extraction step. Compared to others, the methods supplied with commercially available kits at the time of researching this paper require only one organic extraction. This simple but, as it turned out, very useful modification makes it possible to access previously unavailable material. Potential advantages of this modification include a more complete profiling of small non-coding RNAs and a broader access to small sample volumes, as a rule, access to human biological fluids which can be prepared for RNA sequencing on the Illumina platform.

Keywords: RNA extraction, small RNA, next-generation sequencing, cerebrospinal fluid, biological fluids

For citation: Beylerli O.A., Beylerli A.T., Gareev I.F. Extracting Small RNAs from Human Biological Fluids for Subsequent Next-Generation Sequencing. *Creative Surgery and Oncology*. 2019;9(1):80–86. <https://doi.org/10.24060/2076-3093-2019-9-1-80-86>

Beylerli Ozal Arzuman-ogly — Post-graduate student of the Department of Urology with the Course of Additional Professional Education, e-mail: obeylerli@mail.ru, тел.: +79875980003, orcid.org/0000-0002-6149-5460

Beylerli Aferin Tagi-kyzy — Resident of the Department of Obstetrics and Gynecology №1, e-mail: agamidli@mail.ru, orcid.org/0000-0002-3486-6246

Garaev Il'giz Fanilevich — Post-graduate student of the Department of Neurosurgery and Medical Rehabilitation with the Course of Additional Professional Education, e-mail: ilgiz_gareev@mail.ru, orcid.org/0000-0002-4965-0835

Введение

Исследователи, которые хотят выполнить секвенирование нового поколения (NGS), должны решить ряд проблем, связанных со способами и методами подготовки образцов. Способы экстракции РНК из тканей или клеток, создание базы данных для секвенирования и типов секвенирования, которые будут выполняться, становятся решающими факторами в дизайне экспериментальной работы [1]. В частности, для секвенирования различных классов молекул РНК, по крайней мере частично, определяются и упорядочиваются по их размеру. Микро-РНК (miRNAs, 18–22 нуклеотида), малые интерферирующие РНК (siRNAs, 20–25 нуклеотидов) и PIWI-взаимодействующие РНК (piRNA, приблизительно 30 нуклеотидов) являются разновидностями малых некодирующих РНК, участвующих в последовательном ингибировании экспрессии генов на посттранскрипционном уровне [2]. Хотя в настоящее время малые РНК известны как наименьший функциональный класс, но их биологическая значимость для регулирования экспрессии генов все еще изучается на протяжении 20 лет с момента их открытия [3]. С недавних пор NGS используется для получения небольших дифференциальных профилей экспрессии РНК для изучения этапов развития тканей, типов тканей и патологических состояний, таких как онкология, сердечно-сосудистые заболевания и психические расстройства с потенциалом для поиска новых биомаркеров [4–7].

До недавнего времени считалось, что способы экстракции РНК из тканей позволяли извлекать все виды РНК: примерно от длинных до малых РНК, которые включают кодирующие РНК (мРНК), длинные некодирующие РНК (lncRNA), транспортные РНК (тРНК), малые ядрышковые РНК (snoRNA), PIWI-взаимодействующие РНК (piRNA) и микро-РНК (miRNA) [2]. Экстракция всех видов РНК подразумевается в описании многих коммерчески доступных наборов и методов, описывающих изоляцию тотальной РНК. Фактически они используются для методов, которые вообще не извлекают малые РНК, но имеются такие наборы, которые основываются на использовании мини-колонок с диоксидом кремния (SiO₂), которые и проводят экстракцию малых РНК. Кроме того, в ряде наборов использовались соотношения солей и спирта, не достаточные для изоляции малых РНК из образцов. В настоящее время существует множество коммерчески доступных наборов для экстракции малых РНК. Хотя методики имеют некоторые отличия, большинство из них используют тиоцианат гуанидина для денатурирования РНКаз и белков с последующей экстракцией РНК с фенол-хлороформом [8, 9]. Систематическое тестирование показало, что производительность наборов для изоляции РНК варьируется в зависимости от типов образцов [10]. Ряд наборов лучше подходит к конкретным видам образцов, чем к другим. Например, соединительная ткань, такая как мышечная, должна обрабатываться иначе, чем богатая липидами нервная ткань. Лучшим вариантом может быть выбор комплекта, специально разработанного для решения проблем с экстракцией РНК для конкретного типа ткани.

Из трех лучших наборов для изоляции тотальной РНК и ее фракций набор MaxRecovery BiooPure RNA (Bio Scientific, Austin, TX, USA) не был выбран, так как проявлялась некоторая потеря РНК в отдельных образцах. Стандартный набор MirVana Kit (Life Technologies), который в своей методике не предлагает исследователям возможность выделения белка из исходного лизата, хорошо работает, но не был выбран, потому что первый буфер добавляется в соотношении 10:1 к объему образца. Таким образом, для каждого образца объемом 1 мл потребуется более 50 отдельных этапов центрифугирования, что делает этот метод логически необоснованным для выделения РНК из биологических жидкостей. Набор MirVana PARIS (выделения белка и РНК) Kit (Life Technologies) наилучшим образом обеспечивал выход РНК вследствие легкости применения при систематическом сравнении с другими коммерчески доступными наборами и методами [10].

Набор MirVana PARIS включает использование запатентованного лизирующего буфера с β-меркаптоэтанолом, который служит для денатурирования белков биологических жидкостей, экстракции РНК фенол-хлороформом из образца, с высоким содержанием белка, липидов и ДНК, с последующей очисткой на спиртовой/колоночной основе перед элюированием РНК. В этой работе мы описываем метод экстракции малых РНК длиной менее 200 нуклеотидов из биологических жидкостей человека и его оптимизацию по экстракции малых РНК длиной менее 200 нуклеотидов из биологических жидкостей человека [10]. Основные изменения в дополнение к стандартному протоколу, предоставленному изготовителем, включают повторное извлечение РНК вместо удаления остаточного фенол-хлороформа путем добавления воды, свободной от РНКаз, ремиксации и отделения другого объема раствора. Хотя уровень для лучшей экстракции малых РНК с использованием модификаций, предложенных в этой работе, будет варьироваться в зависимости от конкретного набора, к которому применяется эта методика, было показано, что он обладает кроссплатформенной применимостью [10]. Наборы, использующие кислота-фенол-хлороформную основу, могут быть полезны с некоторыми дополнениями для набора mirVana PARIS. Выход РНК из всех образцов, которые были протестированы, получался из второй водной экстракции из остаточного кислота-фенол-хлороформного материала [10]. Поскольку современные методы NGS для малых РНК выполняются отдельно от РНК с более длинной цепочкой нуклеотидов, тот факт, что лучшие наборы для изоляции малых или больших молекул РНК различны, не представляет проблем на момент этой работы.

Материалы

1. MirVana PARIS Kit от Ambion (см. примечание 1):
 - раствор для промывки 1;
 - раствор для промывки 2/3 (см. примечание 2);
 - сборные пробирки и фильтровальные картриджи (см. примечание 3);
 - буфер для лизиса клеток (см. примечание 4);

- 2 денатурирующий раствор, тиоцианат гуанидиния-фенол-хлороформная основа (см. примечание 5);
- раствор для элюирования (см. примечание 6).
- 2. Абсолютный этиловый спирт (95,6–100 %) ACS-класса или лучше (см. примечание 7).
- 3. β -меркаптоэтанол.
- 4. 7 М ацетат аммония.
- 5. Криопробирки 2 мл (для образцов).
- 6. Бенчтоп-центрифуга (скорость не менее 800 об/мин).
- 7. Бокс биологической безопасности, класс II.
- 8. Вытяжной шкаф с отрицательным воздушным потоком (см. примечание 8).
- 9. Центрифуга, способная поддерживать комнатную температуру и центрифугировать по меньшей мере 10 000 об/мин, используя ротор, способный удерживать конические пробирки 15 мл (см. примечание 9).
- 10. Лабораторный нагревательный блок, установленный на 95–100 °С.
- 11. Орбитально-качающийся шейкер (см. примечание 10).
- 12. Пробирки 1,5 мл, не содержащие РНКаз (см. примечание 11).
- 13. Салфетки или растворы в виде спрея для обеззараживания РНКаз (см. примечание 12).

Методы

Приготовление образцов

После взятия биологической жидкости (цереброспинальная жидкость) помещаем образцы в криопробирки 2 мл, их необходимо быстро заморозить в жидком азоте либо в суспензии абсолютного этанола с сухим льдом, чтобы сохранить профиль РНК (см. примечание 13). Использование шкафа биобезопасности требуется при обращении с биологическими образцами для защиты исследователей от воздействия патогенов человека.

Подготовка набора MirVana PARIS Kit

1. Инкубируем компоненты mirVana PARIS Kit при комнатной температуре (см. примечание 14).
2. Добавляем 21 мл 100 % этанола в раствор для промывки РНК (см. примечание 7).
3. Добавляем 40 мл 100 % этанола в раствор для промывки 2/3 (см. примечание 7 и 15).
4. Добавляем 375 мкл β -меркаптоэтанол в 2 денатурирующий раствор см. примечание 16).
5. Добавляем аликвоту 1 мл воды, свободной от РНКаз (см. примечание 6), в микроцентрифужные пробирки 1,5 мл и помещаем их на нагревательный блок, установленный на 95 °С. Эта предварительно нагретая вода будет использоваться для элюирования РНК из мембран мини-колонок на конечной стадии (см. примечание 17).

Измененная методика протокола MirVana PARIS Kit

1. Добавляем равный объем 2 денатурирующего раствора к замороженному образцу (цереброспинальная жидкость) (см. примечание 18).
2. Помещаем образец на орбитально-качающийся шейкер при комнатной температуре до полного оттаивания и смешивания (см. примечание 10).

3. Инкубируем в течение 10 мин при комнатной температуре.
4. Добавляем равные объемы тиоцианат гуанидиния, фенола и хлороформа (кислотно-фенол-хлороформная основа) (см. примечание 19).
5. Смешиваем на вортексе в течение 30 сек.
6. Центрифугируем при 10,000 об/мин в течение 5 мин при комнатной температуре (см. примечание 20).
7. Осторожно снимаем пробирки с центрифуги, и нужно убедиться, что имеются верхний (водный) слой и нижний (органический) слой.
8. Переносим приблизительно 90 % верхней водной фазы от этой первой экстракции в чистую пробирку 2 мл и определяем объем. Позаботьтесь о том, чтобы мениск оставшегося объема водной фазы не касался интерфазы (см. примечание 21). Откладываем в сторону.
9. В оставшийся органический остаток добавляем объем воды, свободной от РНК, эквивалентный водному объему, который был просто перенесен в новую пробирку.
10. Смешиваем на вортексе в течение 30 сек.
11. Центрифугируем при 10,000 об/мин в течение 5 мин при комнатной температуре.
12. Переносим приблизительно 90 % верхней водной фазы этой второй экстракции в ту же самую пробирку, которая содержит водный объем от первой водной фазы (белки и РНК) (см. примечание 21). Остальная часть с органической фазой теперь может быть выброшена (см. примечание 5).
13. Добавляем 1,5 объема 100 % этанола в общий объем полученной жидкости, рассчитанный от удаленного из первого и второго органических экстрактов (см. примечание 7).
14. Инвертируем 10 раз для смешивания и даем раствору инкубироваться при комнатной температуре в течение 10 мин.
15. Добавляем 700 мкл полученной жидкости в мини-колонки и центрифугируем при 800 об/мин при комнатной температуре (см. примечание 22), сбрасываем полученную жидкость из сборной пробирки и повторяем шаги, пока не закончится исследуемый образец (см. примечание 3).
16. Добавляем 700 мкл подготовленного промывочного раствора 1 в мини-колонки и центрифугируем при 800 об/мин в течение 30 сек. для пропускания раствора через мембрану мини-колонок (см. примечания 23 и 22). Сбрасываем полученную жидкость из сборной пробирки (см. примечание 3).
17. Добавляем 500 мкл подготовленного промывочного раствора 2/3 в мини-колонки (см. примечание 24) и центрифугируем при 800 об/мин в течение 30 сек. (см. примечание 22). Сбрасываем полученную жидкость из сборной пробирки.
18. Повторяем шаг 17.
19. Без применения каких-либо других растворов мини-колонок после центрифугирования и их пустые сборные пробирки в течение 30 сек. высушиваются от остаточного этанола.
20. Перемешиваем мини-колонки в новые сборные пробирки (см. примечание 25).

21. Добавляем 100 мкл 95 °С (см. примечание 26) воды, свободной от РНКаз, (см. примечание 6) в мини-колонок и инкубируем при комнатной температуре в течение 1 минуты.
22. Центрифугируем при 10,000 об/мин в течение 1 мин для элюирования РНК через мембрану мини-колонок (см. примечание 27).
23. Повторяем шаги 21 и 22.
24. Фильтрующий компонент мини-колонок можно выбросить, поскольку РНК элюируется из фильтра и находится в сборной пробирке.
25. Центрифугируем данные образцы с РНК на максимальной скорости в течение 1 мин до выпадения осадка.
26. Избегая осадка, переносим РНК из данной пробирки в новую пробирку. Приступаем к осаждению этанолом для подготовки малых РНК к NGS (см. примечание 27).
27. Добавляем 0,5 объема 7 М ацетата аммония до конечной концентрации 2–2,5 М и хорошо смешиваем (см. примечание 28).
28. Добавляем 4 объема от объема РНК абсолютного спирта и хорошо смешиваем. Инкубируем полученный образец при температуре -20 °С с 4 до 12 часов.
29. Центрифугируем при 16,000 об/мин в течение 30 мин. при 4 °С для осаждения РНК.
30. Промываем полученные гранулы дважды 80 % спиртом.
31. Ресуспендируем гранулы РНК в объеме воды, свободной от РНКаз, следуя стандартному протоколу производителя.

Примечания

1. Комплект MirVana PARIS рассчитан на 40 реакций при использовании протокола, предоставленного производителем, и предлагаемых тканей (см. Руководство пользователя Ambion mirVana PARIS Kit). С модифицированным протоколом, описанным здесь, этот комплект представлен приблизительно для 20 мл биожидкости.
2. 2/3 промывочного раствора используется для второй и третьей промывки колонки на основе диоксида кремния, содержащей иммобилизованную РНК.
3. Фильтр мини-колонок и ее сборная пробирка будут повторно использоваться на всех этапах в этом модифицированном протоколе, за исключением последнего, в котором завершена изоляция и очистка РНК.
4. Буфер для лизиса клеток включен в список реагентов, однако он не будет использоваться для текущего метода, который был разработан для образцов биологических жидкостей.
5. Кислота-фенол-хлороформная основа является едкой, поэтому при обращении и утилизации необходимо соблюдать осторожность. Необходимы средства индивидуальной защиты и использование вытяжного шкафа.
6. В текущем протоколе для элюирования тотальной РНК и ее фракций используют воду, свободную от РНКаз.
7. Поскольку соотношение этанола и водного буфера важно независимо от того, растворена ли РНК, или выпала в осадок в растворе, крайне важно использовать абсолютный этанол ACS-класса (ACS — Американское химическое общество) или лучше при приготовлении

спиртовых буферных растворов. Каждый раз, когда обезвоженный этанол подвергается воздействию окружающей среды, в нем растворяется вода из окружающей среды, что впоследствии уменьшает содержание этанола в растворе ниже по потоку.

8. Из-за соображений безопасности, за исключением последнего шага, весь протокол должен выполняться в вытяжном шкафу с отрицательным воздушным потоком, предназначенным для летучих химических веществ.

9. Важным аспектом молекулярной функции всех буферов и растворов является их pH. Поскольку температура оказывает существенное влияние на pH, ее следует контролировать. Все описанные здесь шаги выполняются при комнатной температуре, если не указано иное. Однако центрифугирование может увеличить температуру центрифугируемого образца. Таким образом, центрифуги, используемые на этапах центрифугирования без мини-колонок, должны быть установлены на стандартную температуру окружающей среды 25 °С. Для кратковременных этапов центрифугирования, например для пропускания жидкости через мини-колонок, центрифуга с контролируемой температурой не требуется.

10. Не важно, при какой скорости используется стандартный лабораторный орбитально-качающийся шейкер, если он позволяет тщательно перемешивать замороженные образцы в денатурирующем растворе.

11. Мы обнаружили, что сборные пробирки, поставляемые с комплектом mirVana PARIS Kit, не всегда плотно закрывались. Кроме того, использование пробирок с неплотно закрывающимися крышками приводит к испарению и уменьшает остаточный материал РНК, находящийся в сборной пробирке. Поэтому, как только РНК элюируется из мини-колонок, ее следует перенести в плотно закрывающуюся стерильную пробирку без РНКаз.

12. Очистим рабочий стол и все оборудование, которое будет использоваться для экстракции РНК, с помощью растворов-деактиваторов РНКаз или салфеток в соответствии с рекомендациями производителя для этих продуктов. Следует принять общие меры предосторожности, чтобы свести к минимуму возможное воздействие РНКаз на РНК.

13. Хотя малые РНК относительно стабильны в биологических жидкостях [12], обрабатывая образцы одинаковым способом, каждый раз можно будет гарантировать минимизацию смещения сбора и сохранить общий профиль тотальной РНК. В замороженных образцах РНКазы неактивны из-за низкой температуры, которая не позволяет воде находиться в жидкой форме, необходимой для того, чтобы эти ферменты меняли структуру РНК. Образцы оттаивают в присутствии 2 денатурирующего раствора, чтобы гарантировать, что РНКазы будут денатурированы, поэтому они необратимо инактивируются [11].

14. Набор MirVana PARIS поставляется при комнатной температуре, а компоненты хранятся либо при комнатной температуре, либо при температуре 4 °С в соответствии с правилами производителя. Для использования в обычном режиме или в текущем модифицированном

ном протоколе перед использованием компонентов MirVana Paris Kit необходимо довести их до комнатной температуры.

15. В промывочном растворе 2/3 может образовываться осадок белого цвета, но это не имеет никакого значения, и его следует оставить в бутылке при использовании этого раствора.

16. 2 денатурирующий раствор образует осадок при рекомендуемой температуре хранения 4 °С. После прогрева до комнатной температуры нужно осмотреть, остался ли осадок в растворе. Если присутствует твердый белый осадок, нужно плотно закрыть бутылку и при 37 °С перемешивать его до полного растворения.

17. Для обеспечения герметичности пробирок и исключения испарения раствора под воздействием повышенной температуры и давления при центрифугировании можно использовать алюминиевую фольгу.

18. Оцениваем объем биологического образца. Если пробирка для образцов заполнена больше, чем наполовину, нужно предотвратить добавление равного объема 2 денатурирующего раствора и добавить только 1/10 объема 2 денатурирующего раствора, энергично перемешивая до тех пор, пока замороженный образец не будет слегка разморожен. Перенесите этот образец и остаточный раствор в большую пробирку, где есть оставшийся 2 денатурирующий раствор.

19. Небольшой объем водного буфера покрывает органическую кислотно-фенол-хлороформную основу. При использовании этого реагента убедитесь, что присутствуют два разных слоя. Следует избегать взбалтывания этого раствора, чтобы слои не смешивались. Если раствор выглядит мутным или присутствуют пузырьки воздуха, следует подождать осаждения до тех пор, пока два слоя не будут заметно разделены. При использовании этого раствора обязательно удалите кислотно-фенол-хлороформную основу из-под водного буферного слоя. Когда объем раствора уменьшится, обязательно проконтролируйте, что вы удалили эту основу, а не вышележащий водный буфер.

20. Стадия фазового разделения фенол-хлороформа включает центрифугирование относительно большого объема. Поэтому рекомендуется, чтобы ротор для центрифуги был с регулируемой температурой (см. примечание 9) и был совместим с центрифужными пробирками. Пробирки должны быть способны удерживать раствор в 5 раз больше своего объема.

21. В зависимости от образцов (биологических жидкостей) белая интерфаза может и не наблюдаться, особенно для второй экстракции. При тщательном осмотре фазы должны быть видны и не должны смешиваться при пипетировании верхнего водного объема.

22. Мини-колонок из набора MirVana PARIS были разработаны для протокола изготовителя. С помощью модифицированного метода большие объемы, чем первоначально предполагалось, проходят через весь столбец мини-колонок. Поскольку РНК будет связываться с мембраной (диоксид кремния) столбца мини-колонок, лучше всего тщательно поддерживать целостность столбца. Поэтому максимальная скорость центрифуги-

рования, рекомендуемая для пропускания водного раствора экстракции/этанола, составляет 800 g.

23. Готовый промывочный раствор 1 содержит 21 мл 100 % этанола.

24. Готовый промывочный раствор 2/3 содержит 40 мл 100 % этанола.

25. Чтобы предотвратить проникновение высушенного остаточного материала в свежий резервуар пробирки, очистите внешнюю поверхность колонки фильтра, используя протирание раствором 70 % этанола, но избегайте смачивания фильтра.

26. Разогреваем воду, свободную от РНКаз, на тепловом блоке до 95 °С и используем эту воду для элюирования РНК из мембраны мини-колонок. Чтобы учесть, что при этой температуре происходит испарение, нужно удвоить объем воды, которая будет использоваться, а также она должна быть предварительно нагрета.

27. Если РНК будет использоваться для любых других методов секвенирования, помимо малых РНК, может потребоваться обработка ДНК-образца.

28. Осаждение РНК этанолом должно всегда происходить с добавлением солевых растворов, и они должны быть тщательно перемешаны перед добавлением спирта.

Обсуждение

Мы протестировали различные коммерчески доступные наборы для извлечения РНК и обнаружили, что некоторые из них были более эффективными при выделении малых РНК из биологических жидкостей, чем другие. Также были проверены модификации протоколов, сделанных другими исследователями, для более высокого выхода РНК [13]. Лучшие условия для получения высокого выхода малых РНК из биожидкостей описаны в этой методике, так как мы считаем, что она имеет ценность для исследователей, которые планируют работать с NGS. Настоящее исследование специально было разработано и протестировано для изоляции малых РНК из цереброспинальной жидкости человека для последующей работы с NGN на платформе Illumina (Illumina, San Francisco, CA, USA). Также метод может быть дополнительно применен к образцам слюны и мочи человека [14].

Описанный здесь метод был протестирован и показал, что он улучшает восстановление или выделение малых РНК из цереброспинальной жидкости. Однако этот метод не ограничивается этим типом образцов и может разумно применяться к другим типам биологических жидкостей [15]. Поскольку каждый тип выборки может создавать определенные проблемы, мы настоятельно рекомендуем тестировать различные методы для каждого конкретного типа образца, т. е. типа ткани.

Доказана роль секвенирования следующего поколения в дифференциальной диагностике сложных новообразований. Acosta и др. оценили потенциальное применение NGS в диагностике этих редких новообразований [16]. В исследовании были включены четыре новообразования. Два были диагностированы как смешанная аденонейроэндокринная карцинома желчного пузыря и метастатический папиллярный рак щитовидной железы с плоскоклеточной дедифференцировкой, а два были

интерпретированы как аденокарцинома пищевода в аденокарциному легких и мелкоклеточная карцинома легкого на/в менингеальную меланому. Это исследование иллюстрирует роль NGS в дифференциальной диагностике редких новообразований как дополнения к световой микроскопии и иммуногистохимии.

Заключение

В этой статье мы описали методику для экстракции малых РНК из биологических жидкостей человека для последующего секвенирования нового поколения, которую сочли полезной при исследованиях данных типов РНК в качестве потенциальных биомаркеров. Как указано выше, подготовка образцов, выбор реагентов — немаловажные факторы, учитывая текущую нехватку знаний об их влиянии на последующее секвенирование нового поколения малых РНК. Кроме того, тщательно построенный план эксперимента, связанный с выбором типов образцов и техники экстракции малых РНК, важен для получения хороших результатов в работе с секвенированием нового поколения.

Информация о конфликте интересов.

Конфликт интересов отсутствует.

Информация о спонсорстве.

Данная работа не финансировалась.

Список литературы / References

- Baudhuin L.M. Quality guidelines for next-generation sequencing. *Clin Chem* 2013;59:858–9. DOI:10.1373/clinchem.2013.203091
- Castel S.E., Martienssen R.A. RNA interference in the nucleus: roles for small RNAs in transcription, epigenetics and beyond. *Nature*. 2013;14:100–12. DOI: 10.1038/nrg3355
- Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mel-lo C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998;(391):806–11. DOI: 10.1038/35888
- O'Brien J., Hayder H., Zayed Y., Chun Peng. Overview of MicroRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:402. DOI: 10.3389/fendo.2018.00402
- Wang H., Zhong J., Chai Z., Zhu J., Xin J. Comparative expression profile of microRNAs and piRNAs in three ruminant species testes using next-generation sequencing. *Reprod Domest Anim*. 2018;53(4):963–70. DOI: 10.1111/rda.13195
- Schee K., Lorenz S., Worren M.M., Günther C.C., Holden M., Hovig E. et al. Deep sequencing the microRNA transcriptome in colorectal cancer. *PLoS One*. 2013;8:e66165. DOI: 10.1371/journal.pone.0066165
- Chana G., Bousman C.A., Money T.T., Gibbons A., Gillett P., Dean B. et al. Biomarker investigations related to pathophysiological pathways in schizophrenia and psychosis. *Front Cell Neurosci*. 2013;7:95. DOI: 10.3389/fncel.2013.00095
- Liu L., Wang J., Khanabdali R., Kalionis B., Tai X., Xia S. Circular RNAs: Isolation, characterization and their potential role in diseases. *RNA Biol*. 2017;14(12):1715–21. DOI: 10.1080/15476286.2017.1367886
- Lekchnov E.A., Zaporozhchenko I.A., Morozkin E.S., Bryzgunova O.E., Vlassov V.V., Laktionov P.P. Protocol for miRNA isolation from biofluids. *Anal Biochem*. 2016;499:78–84. DOI: 10.1016/j.ab.2016.01.025
- Burgos K.L., Javaherian A., Bompreszi R., Ghaffari L., Rhodes S., Courtright A. et al. Identification of extracellular miRNA in human cerebrospinal fluid by next-generation sequencing. *RNA*. 2013;5:712–22. DOI: 10.1261/rna.036863.112
- Sun Z., Shi K., Yang S., Liu J., Zhou Q., Wang G. et al. Effect of exosomal miRNA on cancer biology and clinical applications. *Mol Cancer*. 2018;17(1):147. DOI: 10.1186/s12943-018-0897-7
- Anfossi S., Babayan A., Pantel K., Calin G.A. Clinical utility of circulating non-coding RNAs — an update. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018;15(9):541–63. DOI: 10.1038/s41571-018-0035-x
- Amini P., Ettlin J., Opitz L., Iementi E., Malbon A., Markkanen E. An optimised protocol for isolation of RNA from small sections of laser-capture microdissected FFPE tissue amenable for next-generation sequencing. *Mol Biol*. 2017;18(1):22. DOI: 10.1186/s12867-017-0099-7
- Majem B., Li F., Sun J., Wong D.T. RNA sequencing analysis of salivary extracellular RNA. *Methods Mol Biol*. 2017;1537:17–36. DOI: 10.1007/978-1-4939-6685-1_2
- Gautam A., Kumar R., Dimitrov G., Hoke A., Hammamieh R., Jett M. Identification of extracellular miRNA in archived serum samples by next-generation sequencing from RNA extracted using multiple methods. *Mol Biol Rep*. 2016;43(10):1165–78. DOI: 10.1007/s11033-016-4043-6
- Acosta A.M., Al Rasheed M.R.H., Pins M.R., Borgen K.R., Panchal D., Rogozinska M. et al. The role of next-generation sequencing in the differential diagnosis of composite neoplasms. *Hum Pathol*. 2018;81:78–88. DOI: 10.1016/j.humpath.2018.06.022