

Новый и усовершенствованный метод выделения тотальных микроРНК из клеток млекопитающих и приготовления библиотеки для секвенирования на основе лигирования.

Научный руководитель – Шах Махмуд Раихан Закирович

Летова И.А.¹, Шах Махмуд Р.-²

1 - Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, Казань, Россия; 2 - Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, Кафедра микробиологии, Казань, Россия

МикроРНК играют важную роль в регуляции экспрессии генов. Эффективное выделение микроРНК и их секвенирование - единственный инструмент для их качественного и количественного анализа и обнаружения новых видов микроРНК в клетке. Выделение микроРНК и приготовление библиотеки для секвенирования - сложный и дорогостоящий метод. Поэтому цель нашей работы - установление наиболее эффективного, экономичного и ускоренного метода выделения и приготовления библиотеки тотальных микроРНК клеток млекопитающих для секвенирования следующего поколения лигированием, являющегося наиболее точной технологией.

В исследовании для выделения микроРНК использовались эпителиальные клетки почки взрослой самки кокер-спаниеля и эпителиальные клетки легких человека. Тотальная РНК выделена из клеток коммерческим реагентом (TRIzol Reagent, Thermo Fisher, США). При выделении микроРНК из тотальной РНК использовались парамагнитные частицы (Agencourt AMPure, Beckman Coulter, США), предназначенные для выделения, очистки, отбора по размеру ДНК с модификацией, составляющие 0,5 объема тотальной РНК, перед добавлением магнитных частиц образец РНК был инкубирован при 70° С в течение 2 минут. Затем очистка от примесей проводилась с помощью не связывающих РНК 100% изопропанола, 75% этанола последовательно. Проводились гибридизация адаптеров для секвенирования, лигирование, реакция обратной транскрипции реагентами SOLiD Total RNA-Seq Kit, (Life Technologies, США). Очищение проведено набором GeneJet PCR Purification Kit (Thermo Scientific, США). Реакция амплификации кДНК осуществлялась с праймерами, включающими баркоды SOLiD Total RNA-Seq Kit. Были очищены двучечные ДНК от примесей и ДНК размером ниже 100 п.о. с использованием Purelink (Invitrogen, США). Качественный анализ полученных РНК, малых РНК и ДНК проводили реагентами “Agilent RNA 6000 Pico Kit”, “Agilent Small RNA Kit”, “Agilent High Sensivity DNA Kit” (Agilent Technologies, США) на приборе Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, США), соответственно.

В ходе исследования были выделены тотальные РНК клеток (рис. 1), модифицированный метод с использованием парамагнитных частиц, отделивший малые РНК после термообработки (рис. 2). Модифицированный метод приготовления библиотеки секвенирования лигированием исключил все ДНК ниже 100 п.о. и выше 130 п.о. По данным биоанализера в образцах содержались ДНК размером 126 п.о. (рис. 3), а по данным электрофореза в образцах не было ДНК ниже 110 п.о. и выше 130 п.о. (рис. 4). Это необходимое условие для секвенирования лигированием на приборе SOLiD System, где 110-130 п.о. ДНК соответствуют микроРНК размером 18-38 нуклеотидов. Следовательно, термообработка с добавлением магнитных частиц и модифицированный метод приготовления библиотеки - скоростной, эффективный и экономичный метод выделения и приготовления библиотеки тотальных микроРНК клеток млекопитающих для секвенирования лигированием.

Авторы признательны всем сотрудникам междисциплинарного центра протеомного и геномного анализа КФУ.

Иллюстрации

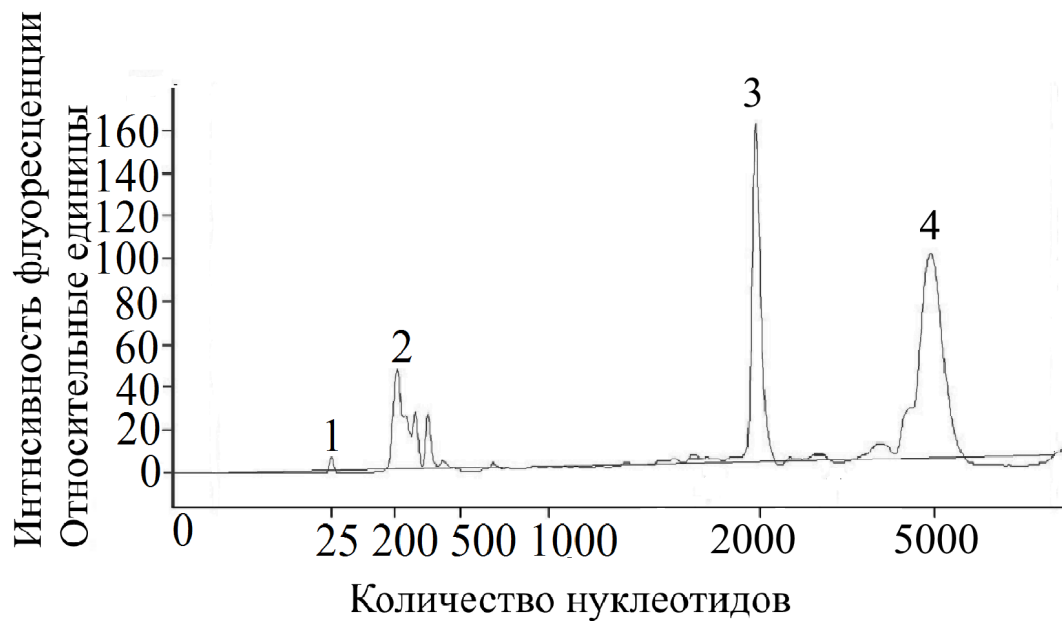


Рис. 1. Анализ выделенных тотальных РНК из клеток (1- маркер, 2 - малые РНК, 3-18S рРНК, 4 - 28S рРНК)

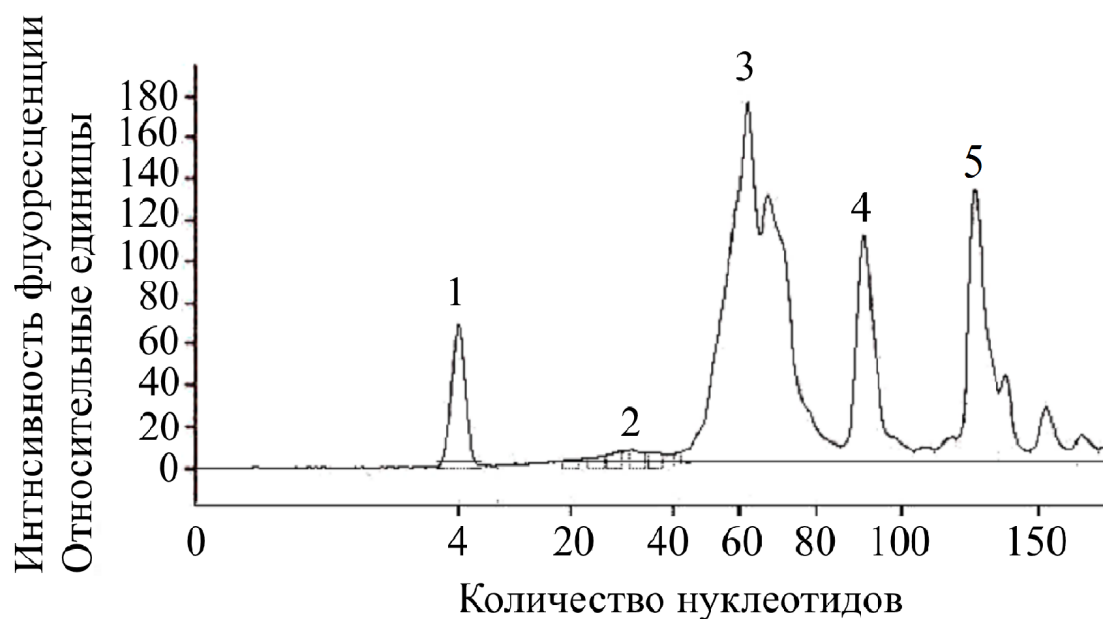


Рис. 2. Анализ выделенных тотальных малых РНК из клеток (1 – маркер, 2 – микроРНК, 3 – тРНК, 4 -5S рРНК, 5 – 5,8S рРНК)

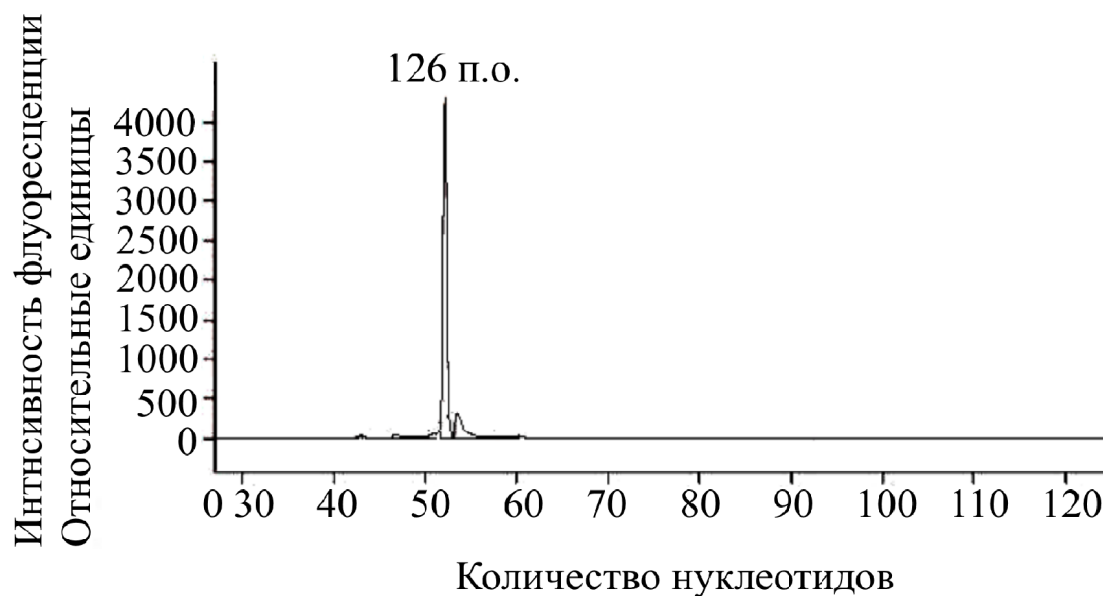


Рис. 3. Качественный анализ ДНК библиотек, полученных из микроРНК клеток, на инструменте биоанализер

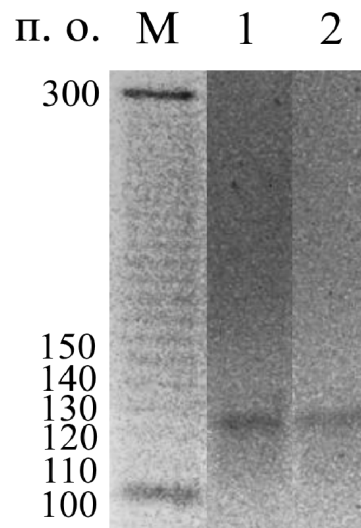


Рис. 4. Анализ размеров ДНК библиотек, полученных из микроРНК клеток, с помощью гель электрофореза (М – маркер, 1 и 2 - библиотеки ДНК, полученные из микроРНК клеток кокерспаниеля и человека)