



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 577.218

doi: 10.17308/sorpchrom.2022.22/10895

Модификация методики выделения микроРНК из растений фенол-хлороформной экстракцией с применением полиэтиленгликоля 1500

Дмитрий Николаевич Федорин¹, Виктория Олеговна Чуйкова¹, Александр Трофимович Епринцев¹✉

¹Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия, bc366@bio.vsu.ru✉

Аннотация. МикроРНК – класс малых некодирующих РНК, имеющих длину от 18 до 25 нуклеотидов и встречающихся в большинстве эукариотических организмов. Важное значение микроРНК могут играть в эпигенетических механизмах регуляции генома, включая метилирование ДНК, модификацию РНК и гистонов. Современные методы обнаружения и количественного определения микроРНК в значительной степени основаны на клонировании, нозерн-блоттинге или удлинении праймера, но каждый из них требует наличия чистого препарата анализируемого типа РНК. Стандартный метод выделения РНК, основанный на фенол-хлороформной экстракции со специфическими соосадителями нуклеиновых кислот, позволяет получать препараты суммарной клеточной РНК с преобладанием высокомолекулярных типов рибонуклеиновых кислот. Это в значительной степени затрудняет проведение идентификации и количественной оценки микроРНК в препаратах образцов. Модификация метода фенол-хлороформной экстракции РНК, основанном на ее преципитации ДНК со специфическим осадителем, таким как хлорид лития, показала, что применение полиэтиленгликоля 1500 с использованием в качестве осадителя 2.5 М LiCl в присутствии 96% этанола обеспечивает высокий выход и качественную экстракцию микроРНК, которую можно использовать для дальнейших аналитических исследований. Проведение ПЦР для оценки качества выделенной микроРНК со специфическими праймерами к miR165a показало наличие одного продукта амплификации размером около 80 п.н., что соответствует теоретическим значениям, рассчитанным на основе разработанного зонда для данной микроРНК. Положительный результат ПЦР свидетельствует о наличии в используемой матрице анализируемой микроРНК. Следовательно, применение модифицированной методики выделения РНК с использованием полиэтиленгликоля 1500 (ПЭГ 1500) в качестве элемента разделения высокомолекулярных и низкомолекулярных нуклеиновых кислот позволило получить препараты микроРНК, которые можно применять для дальнейших аналитических исследований.

Ключевые слова: *Zea mays*, микроРНК, полиэтиленгликоль, полимеразная цепная реакция, ампликон.

Благодарности: работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2020-2022 годы, проект № FZGU-2020-0044.

Для цитирования: Федорин Д.Н., Чуйкова В.О., Епринцев А.Т. Модификация методики выделения микроРНК из растений фенол-хлороформной экстракцией с применением полиэтиленгликоля 1500 // *Сорбционные и хроматографические процессы. 2022. Т. 22, № 6. С. 885-892.* <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2022.22/10895>

Original article

Modification of the method for isolating miRNAs from plants phenol-chloroform extraction using polyethylene glycol 1500

Dmitry N. Fedorin¹, Victoria O. Chuykova¹, Alexander T. Eprintsev¹✉

¹Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, bc366@bio.vsu.ru✉

Abstract. MicroRNAs are a class of small non-coding RNAs ranging in length from 18 to 25 nucleotides and found in most eukaryotic organisms. MicroRNAs can play an important role in epigenetic mechanisms of genome regulation, including DNA methylation, RNA and histone modification. Current methods for the detection and quantification of microRNAs are largely based on cloning, northern blotting, or primer extension, but each requires a pure preparation of the RNA type being analyzed. The standard RNA isolation method based on phenol-chloroform extraction with specific nucleic acid co-precipitants makes it possible to obtain preparations of total cellular RNA with a predominance of high-molecular types of ribonucleic acids. This greatly complicates the identification and quantification of miRNAs in sample preparations. Modification of the method of phenol-chloroform extraction of RNA, based on its precipitation of DNA with a specific precipitant, such as lithium chloride, showed that the use of polyethylene glycol 1500 with 2.5 M LiCl as a precipitant in the presence of 96% ethanol provides a high yield and high-quality microRNA extraction, which can be used for further analytical studies. PCR to assess the quality of the isolated microRNA with specific primers for miR165a showed the presence of one amplification product about 80 bp, which corresponds to the theoretical values calculated on the basis of the developed probe for this microRNA. A positive PCR result indicates the presence of the analyzed miRNA in the matrix used. Therefore, the use of a modified RNA isolation technique using polyethylene glycol 1500 (PEG 1500) as an element for the separation of high and low molecular weight nucleic acids made it possible to obtain miRNA preparations that can be used for further analytical studies.

Keywords: *Zea mays*, miRNA, polyethylene glycol, polymerase chain reaction, amplicon.

Acknowledgments: the study received financial support from the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation within the framework of State Contract with universities regarding scientific research in 2020-2022, project no. FZGU-2020-0044.

For citation: Fedorin D.N., Chuykova V.O., Eprintsev A.T. Modification of the method for isolating miRNAs from plants phenol-chloroform extraction using polyethylene glycol 1500. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2022. 22(6): 885-892. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2022.22/10895>

Введение

Последнее десятилетие сопровождается появлением большого количества исследований, посвященных роли малых, не кодирующих белок молекул РНК (микроРНК). Выявлена ключевая роль микроРНК в связывании с 3'-нетранслируемым концом мРНК и последующем индуцировании деградации мРНК или ингибировании трансляции мРНК. МикроРНК, как эпигенетические модуляторы, влияют на уровни белка целевых мРНК без модификации последовательностей генов. Кроме того, микроРНК также могут регулироваться эпигенетическими модификациями, включая метилирование ДНК, модификацию РНК и гистонов [1].

Взаимные действия микроРНК и эпигенетического пути, по-видимому, образуют петлю микроРНК-эпигенетической обратной связи и оказывают обширное влияние на изменение экспрессии генов. Нарушение регуляции петли микроРНК-эпигенетической обратной связи мешает физиологическим и патологическим процессам и способствует возникновению

различных нарушений. В дополнение к тому, что микроРНК сами регулируются эпигенетическим механизмом [2], они также могут влиять на экспрессию компонентов данного процесса, нацеливаясь на ферменты, участвующие в контроле различных эпигенетических процессов. Связанные с изменением метильного статуса ферменты, такие как DNMTs, TETs, HDAC и EZH могут регулироваться микроРНК через эпигенетические механизмы и называются эпи-микроРНК. Экспрессия этих микроРНК имеет важное значение для эпигенетической регуляции большого количества путей клеточного метаболизма и различных процессов [3].

С момента открытия miRNAs большие успехи в характеристике этих семейств генов определили механизм их функций в регуляции генов [4]. Современные методы обнаружения и количественного определения miRNAs в значительной степени основаны на клонировании, нозерн-блоттинге [5] или удлинении праймера [6]. Хотя микрочипы могут повысить производительность профилирования микроРНК, метод относительного

тельно ограничен с точки зрения чувствительности и специфичности [7, 8]. ПЦР в реальном времени является «золотым» стандартом для количественной оценки экспрессии генов [9-11]. Важным при использовании метода ПЦР в реальном времени для количественной оценки микроРНК является ее экстракция из клетки. Неэффективное выделение микроРНК может повлиять на последующий анализ и даже привести к спорным полученным результатам.

В связи с этим, целью работой являлось модифицировать методику выделения РНК из растений с помощью фенол-хлороформной экстракции для получения препаратов микроРНК.

Экспериментальная часть

В качестве объекта для исследования были использованы листья 14-дневной кукурузы (*Zea mays* L.), которая была выращена гидропонным способом при дневном 12 часовом свете. Белый свет получали от ламп дневного света в установке «Флора-1». Красный и дальний красный свет получали с помощью светодиодов с областью испускания 640-680 нм (КИПД40М40-К-П6, Россия) и 710-750 нм (3Л127А-5, Россия). Интенсивность света

составляла 4 мкмоль квантов $m^{-2} \cdot c^{-1}$. Данная интенсивность света достаточна для возникновения сигнальных реакций, связанных с участием фитохромной системы, но не приводит к интенсификации протекания фотосинтеза. Опыты по изучению влияния света различной длины волны на растения проводили по схеме, представленной на рисунке 1.

Выделение суммарной РНК из растительных образцов осуществляли методом гуанидинтиоцианат-фенол-хлороформной экстракции. В качестве осадителя использовали LiCl [12]. Качественный анализ РНК проводили путем электрофоретического исследования в геле 1% агарозы. Красителем выступал бромистый этидий.

Для получения кДНК анализируемой микроРНК проводили обратную транскрипцию со специфическим разработанным зондом для miR165a. Параметры проведения обратной транскрипцию следующие: инкубация смеси при 16°C – 30 мин, 42°C – 30 мин, 85°C – 5 мин [13].

Полимеразную цепную реакцию с генспецифическими праймерами проводили с помощью набора реактивов AmpliSence (Хеликон, Россия). Нуклеотидный состав праймеров *mir*: прямой – 5' cactgatcggac-caggctca 3'; обратный – 5' gtcgatccagtg-cagggtcc 3'. Параметры амплификации

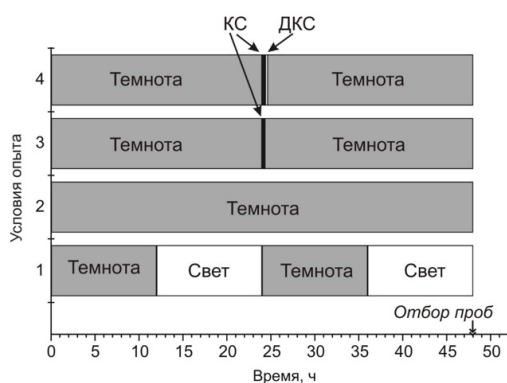


Рис. 1. Схема постановки эксперимента по созданию светового режима.

1 – контрольные растения, выращенные по вышеуказанной методике; 2 – растения, инкубируемые в темноте, далее обозначаются как «темнота»; 3 – растения, облученные красным светом с длиной волны 660 нм, далее обозначаются как «КС»; 4 – растения, облученные дальним красным светом с длиной волны 730 нм, далее обозначаются как «ДКС»; 5 – растения, облученные последовательно красным и дальним красным светом с длинами волн 660 и 730 нм, далее обозначаются как «КС+ДКС».

Fig. 1. Scheme of setting up an experiment to create a light mode.

были следующие: предварительная денатурация – 95°C 5 минут, цикл – 95°C – 30 сек., 58°C – 30 сек., 72°C – 30 сек., финальная элонгация – 72°C – 10 минут.

Денситометрические исследования проводили на электрофореграммах РНК в 1% агарозном геле, с применением программного обеспечения Gel Analyzer 19.1.

Опыты проводились в 3-х кратной биологической и 4-х кратной аналитической повторности. В таблицах и на рисунках представлены данные опытов, в которых каждое значение это среднее арифметическое, посчитанное по результатам трех повторностей. Для получения достоверных данных использовались методы статистической обработки. Результаты являются достоверными, если различия между ними не больше $p \leq 0.05$ [14].

Обсуждение результатов

Применение фенол-хлороформной экстракции суммарной РНК из клеток растений с последующей дополнительной стадией специфического отделения микроРНК позволило получить ее препарат для использования при проведении качественной ПЦР.

На первом этапе выделения суммарной РНК клетки применяли фенол-хлороформную экстракцию со специфическим соосадителем 12 М LiCl в присутствии 96% этанола. Препараты всех видов РНК, в том числе микроРНК, полученных на этом этапе, анализировали электрофоретическим способом в 1%-ном агарозном геле.

Применение фенол-хлороформной экстракции позволило выделить общую РНК клетки практически без следов дегградации (рис. 2А). Об этом свидетельствует наблюдаемое на геле преобладание количества 28S рРНК над 18S рРНК, что является одним из важных критериев качества препарата РНК. Кроме того, результаты денситограммы указывают на присутствие в изучаемых препаратах низкомолекулярных нуклеиновых кислот, к которым относится и микроРНК (рис.

2Б). Следовательно, метод фенол-хлороформной экстракции позволяет с высокой эффективностью экстрагировать из растительной клетки все виды РНК, как высокомолекулярные, так и низкомолекулярные.

Для преципитации низкомолекулярных РНК из суммарной фракции, нами был применен в качестве специфического соосаителя ПЭГ 1500. Эффективность выделения микроРНК из суммарной фракции повышалась при использовании 2.5 М LiCl и этилового спирта. Применение LiCl при осаждении микроРНК позволило дополнительную провести очистку, поскольку хлорид лития не осаждает ДНК и белок. Применение электрофореза в 1%-ом агарозном геле для оценки качества выделенной микроРНК позволило установить эффективность используемой схемы, поскольку на электрофореграмме не обнаружено высокомолекулярных РНК, прежде всего 18S и 28S рРНК (рис. 3А). Также показано с применением анализа гелевой пластинки денситометрическим методом наличие низкомолекулярных нуклеиновых кислот, что указывает на эффективность применяемого в нашем исследовании подхода (рис. 3Б).

Сочетание в качестве осадителей таких веществ как ПЭГ 1500, 2.5 М LiCl и 96% этилового спирта позволило провести отделение высокомолекулярных РНК от низкомолекулярных, что является основным критерием получения микроРНК. Нити ПЭГ при взаимодействии с РНК стерически и электростатически экранируют ее, что способствует ее стабильности в том числе и при действии специфических осадителей [15].

При этом, ПЭГ взаимодействует с высокомолекулярной РНК [16], что приводит к ее экранированию от LiCl и комплексообразование происходит только с низкомолекулярной РНК. Подобный эффект способствует разделению в присутствии 2.5 М LiCl и 96% этилового спирта РНК по их молекулярной массе, малые

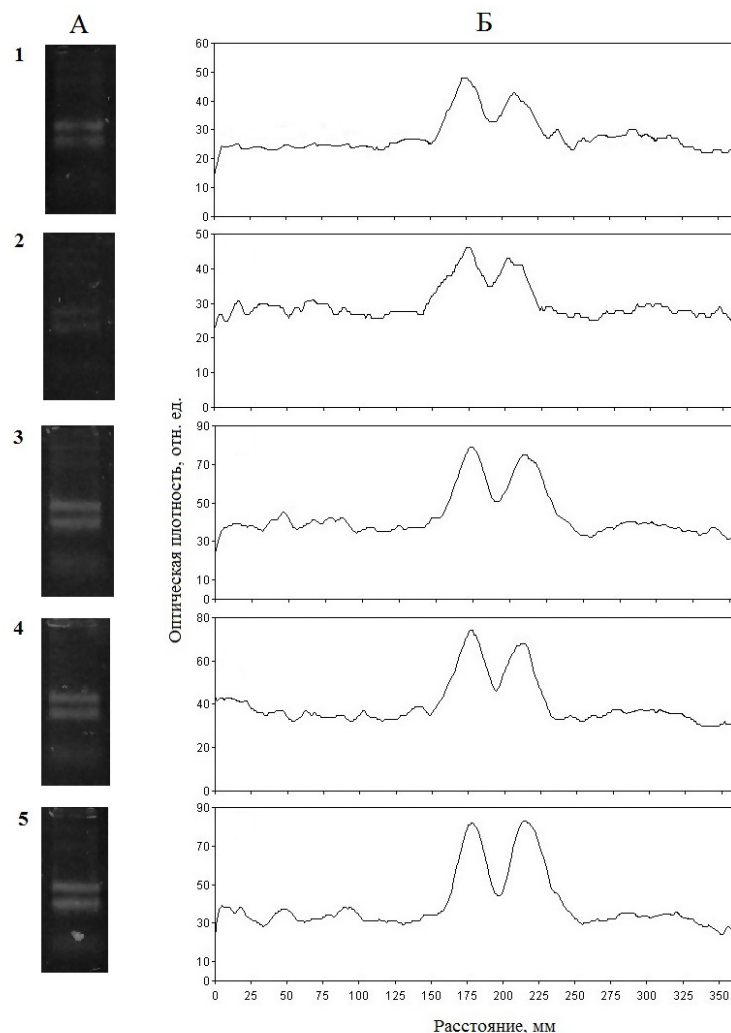


Рис. 2. Экстракция суммарной клеточной РНК из листьев кукурузы при облучении светом разной длины волны. А – качественное определение РНК электрофорезов в 1% агарозном геле. Б – денситограмма образцов суммарной РНК.

Fig. 2. Extraction of total cellular RNA from corn leaves under irradiation with light of different wavelengths. А – qualitative determination of RNA electrophoresis in 1% agarose gel. В – densitogram of total RNA samples.

РНК денатурируются в присутствии этанола. В итоге, ПЭГ с низкой молекулярной массой способствует дестабилизации структуры РНК, что в совокупности со специфическим осадителем хлоридом лития, приводит к более эффективному комплексообразованию и выделению низкомолекулярных РНК.

Проведенная обратная транскрипция РНК образцов с последующим ПЦР-анализом со специфическими праймерами к микроРНК miR165a свидетельствуют о качестве выделенной микроРНК из клеток листьев кукурузы при их облучении

светом разной длины волны. На электрофореграмме, при использовании 1%-го агарозного геля, позволяющего разделять нуклеиновые кислоты на основе их молекулярных масс [17, 18], обнаружено наличие одной полосы в каждой из проб микроРНК с длиной около 80 п.н., что соответствует теоретическому значению размера ампликона (рис. 4).

Применение модифицированной методики выделения РНК с использованием ПЭГ 1500 в качестве элемента разделения высокомолекулярных и низкомолекуляр

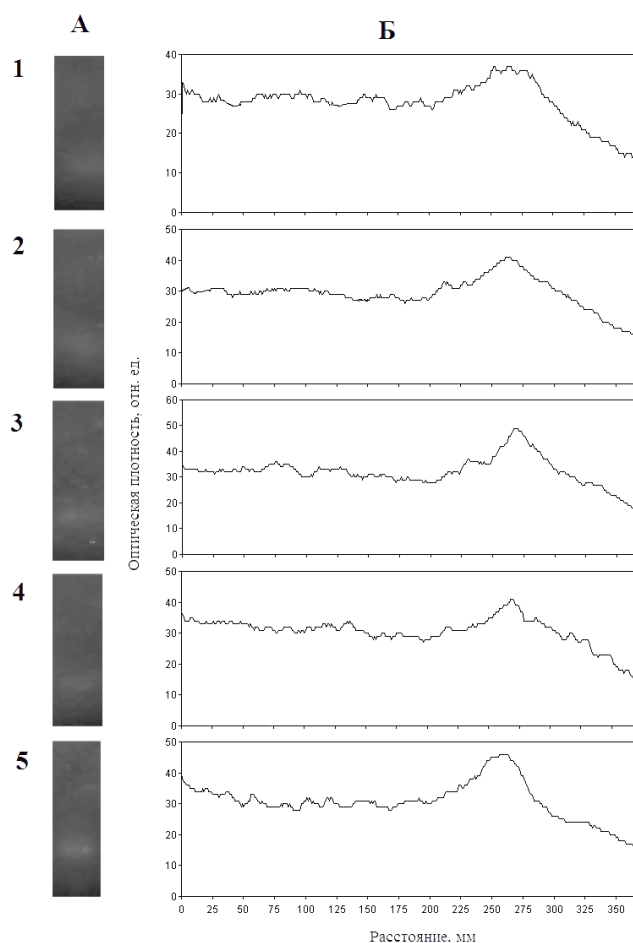


Рис. 3. Выделение микроРНК из суммарной РНК клеток листьев кукурузы при облучении светом разной длины волны. А – качественное определение РНК электрофорезов в 1% агарозном геле. Б – денситограмма образцов суммарной РНК.

Fig. 3. Isolation of microRNA from the total RNA of corn leaf cells when irradiated with light of different wavelengths. А – qualitative determination of RNA electrophoresis in 1% agarose gel. В – densitogram of total RNA samples

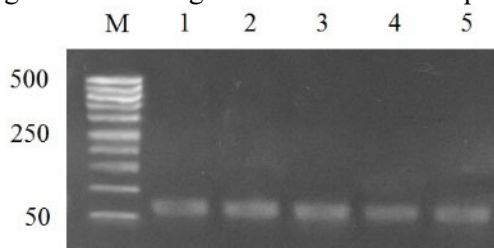


Рис. 4. Электрофореграмма ПЦР-продуктов со специфическим праймерами к miR165a.
 Fig. 4. Electrophoregram of PCR products with specific primers to miR165a.

ных нуклеиновых кислот позволило получить препараты микроРНК, которые можно применять для дальнейших аналитических исследований.

Заключение

Результаты проведенного исследования показали, что модификация фенол-

хлороформного метода экстракции суммарной клеточной РНК позволяет осуществить выделение высококачественной микроРНК, которая может использоваться при исследовании ее содержания в клетках исследуемых организмов методом ПЦР в реальном времени. экспрессии



генов в медицинских исследованиях. Замечательную роль выделении микроРНК из суммарной клеточной РНК сыграло применение в качестве ее специфического соосаждителя ПЭГ 1500. При этом, использование дополнительных компонентов, таких как 2.5 М LiCl и 96% этилового спирта, способствовало не только специфической преципитации микроРНК, но и дополнительной ее очистке от ДНК. Это особенно важно при последующем анализе микроРНК методом ПЦР, поскольку присутствие ДНК в образце может приводить к формированию нецелевых ампликонов и, как следствие, снижению эффективности всего анализа.

Список литературы/References

- 1 Chuang J.C., Jones P.A Epigenetics and MicroRNAs. *Pediatric Research*. 2007; 61: 24-29.
- 2 Arif K.M.T., Elliott E.K., Haupt L.M., Griffiths L.R. Regulatory Mechanisms of Epigenetic miRNA Relationships in Human Cancer and Potential as Therapeutic Targets. *Cancers (Basel)*. 2020; 12: 2922.
- 3 Yao Q., Chen Y. Zhou X. The roles of microRNAs in epigenetic regulation. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2019; 51: 11-17.
- 4 He L., Hannon G.J. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature Reviews Genetics*. 2004; 5: 522-531.
- 5 Lagos-Quintana M., Rauhut R., Lendeckel W., Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*. 2001; 294: 853-858.
- 6 Zeng Y., Cullen B.R. Sequence requirements for micro RNA processing and function in human cells. *RNA*. 2003; 9: 112-123.
- 7 Krichevsky A.M., King K.S., Donahue C.P., Khrapko K., Kosik K.S. A microRNA array reveals extensive regulation of microRNAs during brain development. *RNA*. 2003; 9: 1274-1281.
- 8 Liu C.G., Calin G.A., Meloon B., Gamliel N., Sevignani C., Ferracin M., Dumitru C.D., Shimizu M., Zupo S., Dono M., Alder H., Bullrich F., Negrini M., Croce C.M. An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2004; 101: 9740-9744.
- 9 Nicot N., Hausman J-F., Hoffmann L., Evers D. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *Journal of Experimental Botany*. 2005; 56: 2907-2914.
- 10 Heid C.A., Stevens J., Livak K.J., Williams P.M. Real time quantitative PCR. *Genome Research*. 1996; 6: 986-994.
- 11 Chen C., Ridzon D.A., Broomer A.J., Zhou Z., Lee D.H., Nguyen J.T., Barbisin M., Xu N.L., Mahuvakar V.R., Andersen M.R., Lao K.Q., Livak K.J., Guegler K.J. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Research*. 2005; 33: e179.
- 12 Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*. 1987; 162: 156-159.
- 13 Kramer M.F. Stem-Loop RT-qPCR for miRNAs. *Current Protocols in Molecular Biology*. 2011; CHAPTER: Unit15.10: 1-15.

Модификация метода выделения РНК с применением ПЭГ 1500 позволила выделить высококачественной микроРНК из растительных клеток, которая может быть использована в аналитических исследованиях с применением качественной и количественной ПЦР.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет известных финансовых конфликтов интересов или личных отношений, которые могли бы повлиять на работу, представленную в этой статье.



14 Lakin G.F. Biometrics. M.: Higher school, 1990. 351p.

15 Yoshinaga N., Naito M., Tachihara Y., Boonstra E., Osada K., Cabral H., Uchida S. PEGylation of mRNA by Hybridization of Complementary PEG-RNA Oligonucleotides Stabilizes mRNA without Using Cationic Materials. *Pharmaceutics*. 2021; 13: 800.

16 An Z., Wang Q., Hu Y., Zhao Y., Li Y., Cheng H., Huang H. Co-extraction of high-quality RNA and DNA from rubber

tree (*Hevea brasiliensis*). *African Journal of Biotechnology*. 2012; 11: 9308-9314.

17 Selemenov V.F., Rudakova L.V., Rudakov O.B., Belanova N.A., Nazarova A.A. Fosfolipidy na fone prirodnyh matric Voronezh. Voronezh: Publishing House. Center "Scientific book". 2020. 318 p.

18 Selemenov V.F., Rudakov O.B., Slavinskaya G.V., Drozdova N.V. Pigmenty pishchevyh proizvodstv (melanoidiny). M: Delhi print. 2008. 246 p.

Информация об авторах / Information about the authors

Д.Н. Федорин – доцент кафедры биохимии и физиологии клетки, доцент, кандидат биологических наук. Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

В.О. Чуйкова – бакалавр кафедры биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

А.Т. Епринцев – заведующий кафедрой биохимии и физиологии клетки, профессор, доктор биологических наук. Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

D.N. Fedorin – Associate Professor of the Department of Biochemistry and Cell Physiology, Associate Professor, Candidate of Biological Sciences. Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation

V.O. Chuikova – Bachelor of the Department of Biochemistry and Cell Physiology, Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation

A.T. Eprintsev – Head of the Department of Biochemistry and Cell Physiology, Professor, Doctor of Biological Sciences. Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation

Статья поступила в редакцию 10.10.2022; одобрена после рецензирования 16.11.2022; принята к публикации 23.11.2022.

The article was submitted 11.12.2022; approved after reviewing 16.11.2022; accepted for publication 23.11.2022.