

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 577.218

doi: 10.17308/sorpchrom.2025.25/13581

### Применение модифицированного SEPHADEX<sup>R</sup> в качестве аффинного сорбента для выделения микроРНК775А

Дмитрий Николаевич Федорин<sup>1</sup>✉, Анна Евгеньевна Хомутова<sup>1</sup>,  
Екатерина Валерьевна Хомутова<sup>2</sup>, Александр Трофимович Епринцев<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия, bc366@bio.vsu.ru✉

<sup>2</sup>Институт физико-органической химии и углехимии им. Л.М. Литвиненко, Донецк, Россия

**Аннотация.** Важным показателем в исследованиях малых некодирующих РНК является их количество, в связи с чем возникает необходимость получения их в чистом виде. Существует несколько методик выделения микроРНК, основанных на различных принципах, в каждом из которых есть недостатки. Стандартные методы выделения РНК из растений, основанные на фенол-хлороформной экстракции со специфическими соосадителями нуклеиновых кислот, таким как хлорид, позволяют 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. Изучение микроРНК и применение их в биотехнологии – активно развивающаяся область науки, поэтому разработка метода очистки для конкретной микроРНК позволит использовать данные малые РНК, например, в качестве биомаркеров. Нами был разработан протокол получения аффинного сорбента на основе Sephadex<sup>R</sup> G-75, представляющего собой полимерную декстрановую подложку с прикрепленными к ней комплементарными нуклеотидными последовательностями к микроРНК775А. В качестве линкера выступает аденозинтрифосфат, который под воздействием УФ-излучения присоединяется к цепочке декстранов, как предполагается, путем образования эфирной связи. Вследствие прикрепления dATФ к сефадексу, появилась возможность провести лигазную реакцию с комплементарной последовательностью, представляющую собой лиганд для малой РНК, с флуоресцентно-меченым карбокси-Х родамином (ROX) олигонуклеотидом на 3'-конце. УФ-модифицированный Sephadex<sup>R</sup> G-75 с присоединенным лигандом, комплементарным к микроРНК775А, позволил выделить анализируемую микроРНК из общей мРНК клеток листьев кукурузы. Результаты аффинной хроматографии с применением модифицированного Sephadex<sup>R</sup> G-75 подтвердились ПЦР в реальном времени. Разработанный метод аффинной хроматографии для микроРНК775А позволил получить ее гомогенный препарат с эффективностью выделения 92%. Оценка количественного содержания других микроРНК (микроРНК165а, микроРНК159b) в образце с суммарной РНК, выделенной из растительного материала, не показала их наличия, что указывает на специфичность полученного модифицированного Sephadex<sup>R</sup> G-75 к целевой микроРНК775А.

**Ключевые слова:** микроРНК, аффинная хроматография, Sephadex, dATФ, УФ-излучение.

**Для цитирования:** Федорин Д.Н., Хомутова А.Е., Хомутова Е.В., Епринцев А.Т. Применение модифицированного SEPHADEX<sup>R</sup> в качестве аффинного сорбента для выделения микроРНК775А // Сорбционные и хроматографические процессы. 2025. Т. 25, № 6. С. 972-980. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2025.25/13581>

Original article

### Application of modified SEPHADEX<sup>R</sup> as an affinity sorbent for isolation of microRNA775A

Dmitry N. Fedorin<sup>1</sup>✉, Anna E. Khomutova<sup>1</sup>, Ekaterina V. Khomutova<sup>2</sup>,  
Alexander T. Eprintsev<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, bc366@bio.vsu.ru✉

<sup>2</sup>L.M. Litvinenko Institute of Physical-Organic Chemistry and Coal Chemistry, Donetsk, Russian Federation

**Abstract.** An important indicator in the study of small non-coding RNAs is their quantity, which necessitates their obtaining in pure form. There are several methods for isolating microRNAs based on different principles, each of which has its drawbacks. Standard methods for isolating RNA from plants based on phenol-chloroform extraction with specific co-precipitants of nucleic acids, such as chloride, allow obtaining preparations of total cellular RNA with a predominance of high-molecular types of ribonucleic acids. This significantly complicates the identification and quantitative assessment of microRNA in sample preparations. The study of microRNA and their application in biotechnology is an actively developing field of science, so the development of a purification method for a specific microRNA will allow using these small RNAs, for example, as biomarkers. We have developed a protocol for obtaining an affinity sorbent based on SephadexR G-75, which is a polymer dextran substrate with complementary nucleotide sequences to microRNA775A attached to it. Adenosine triphosphate acts as a linker, which, under the influence of UV radiation, is attached to the dextran chain, presumably by forming an ether bond. Due to the attachment of dATP to Sephadex, it became possible to perform a ligase reaction with a complementary sequence, which is a ligand for small RNA, with a fluorescently labeled carboxy-X rhodamine (ROX) oligonucleotide at the 3' end. UV-modified SephadexRG-75 with an attached ligand complementary to microRNA775A allowed the isolation of the analyzed microRNA from total mRNA of maize leaf cells. The results of affinity chromatography using the modified SephadexRG-75 were confirmed by real-time PCR. The developed method of affinity chromatography for microRNA775A allowed obtaining its homogeneous preparation with an extraction efficiency of 92%. Evaluation of the quantitative content of other microRNAs (microRNA165a, microRNA159b) in a sample with total RNA isolated from plant material did not show their presence, which indicates the specificity of the obtained modified SephadexRG-75 to the target microRNA775A.

**Key words:** microRNA, affinity chromatography, Sephadex, dATP, UV radiation

**For citation:** Fedorin D.N., Khomutova A.E., Khomutova E.V., Eprintsev A.T. Application of Modified SEPHADEX<sup>R</sup> as an Affinity Sorbent for Isolation of MicroRNA775A. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2025. 25(6): 972-980. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2025.25/13581>

## Введение

В настоящее время большое внимание уделяют исследованиям роли малых некодирующих РНК, в частности, микроРНК. Важным показателем в исследованиях малых некодирующих РНК является их количество, в связи с чем возникает необходимость получения их в чистом виде. Существует несколько методов выделения микроРНК, основанных на различных принципах, в каждом из которых есть недостатки. Стандартные методы выделения РНК из растений, основанные на фенол-хлороформной экстракции со специфическими соосадителями нуклеиновых кислот, таким как хлорид лития [1], позволяют 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.

Полимерные носители, содержащие нуклеиновые кислоты (НК) и их фрагменты, уже давно привлекают внимание

специалистов в различных областях биохимии, геной инженерии и молекулярной биологии. Так НК-содержащие сорбенты являются эффективными инструментами для выделения отдельных НК и НК-зависимых ферментов. Синтез аффинных сорбентов основан на уникальном принципе: лиганды (например, полинуклеотиды) иммобилизуются на носителе через линкер или спейсер, либо без них. Методы иммобилизации НК на полимерные носители условно можно разделить на два типа: чисто химические способы, когда ковалентное присоединение НК к матрице происходит в результате химической реакции, и другие способы, когда для присоединения НК помимо химических реагентов необходимо введение ферментов, либо применение специального оборудования или особых условиях, например, облучения [2].

Для аффинной хроматографии РНК используются различные матрицы, которые иммобилизуют РНК на твердой основе ковалентно или нековалентно. Например, сефароза, активированная

бромистым цианогеном, и агароза с дигиразином адипиновой кислоты широко используются для ковалентной иммобилизации РНК. Также белки, связанные с поли-А-хвостовой РНК, могут быть выделены с помощью поли-У сефарозы, которая нековалентно иммобилизует поли-А-хвостовую РНК. Если говорить о нековалентных взаимодействиях, то РНК, содержащая распознающие последовательности для MS2 (белка оболочки бактериофага), может прикрепляться к остаткам амилозы с помощью рекомбинантного химерного белка MS2-MBP (белок, связывающий мальтозу) [3,4].

В качестве матрицы для хроматографии может выступать декстран. Он состоит из звеньев D-глюкозы, соединенных  $\beta$ -1,6-связями. Перекрестные сшивки между цепями декстрана образуются под действием эпихлоргидрина. Декстран устойчив в щелочной среде до pH 12 и обладает гидрофильными свойствами. Примером может выступать Sephadex. Диапазон фракционирования регулируется путем изменения степени сшивания декстрановых остатков. Сефадекс стабилен в буферных растворах с добавками как ионных, так и неионных детергентов, а также денатурирующих агентов. Существуют различные типы сефадексов с селективностью к определенным размерам молекул. Хотя коммерческие хроматографические колонки с сефадексом в качестве сорбента чаще всего называют обессоливающими, область применения их значительно шире. Так с помощью сефадексов очищают культуральные жидкости перед анионообменной хроматографией от фенолового красного, или удаляют свободные, непрореагировавшие низкомолекулярные метки, такие как [a-32P] аденозинтрифосфат (АТФ), в реакциях мечення нуклеиновых кислот и другие [5].

Разработанные ранее способы очистки целевых микроРНК основаны на применении в качестве разделяющего элемента белка (антитела или биотин), которые

очень чувствителен к внешним параметрам, в том числе и температуре, повышение которой вызывает конформационные изменения и снижает эффективность очистки микроРНК. В связи с этим, целью данного исследования является разработка способа выделения в чистом виде целевой зрелой микроРНК775A с применением Sephadex<sup>R</sup> G-75 в качестве аффинного сорбента.

### Экспериментальная часть

Выделение и аналитический электрофорез нуклеиновых кислот. Нуклеиновые кислоты из листьев кукурузы выделяли методом фенол-хлороформной экстракции с хлоридом лития в качестве осадителя РНК [6]. Использованы листья 14-дневной кукурузы (*Zea mays* L.), которая была выращена гидропонным способом при дневном 12 часовом свете, интенсивность света составляла 90 мкмоль квантов  $m^{-2} \cdot s^{-1}$ . Качественный анализ нуклеиновых кислот проводили путем электрофоретического исследования в геле 1% агарозы. Красителем выступал бромистый этидий.

Проведение обратной транскрипции. Для получения кДНК проводили обратную транскрипцию с набором MMLV (СибЭнзим, Россия) со специфическими разработанными зондами для микроРНК775A [7], микроРНК165a [8], микроРНК159 [9] и Oligo(dT)<sub>15</sub> для мРНК, для чего брали 100 нг нуклеиновых кислот из каждой фракции. Параметры проведения обратной транскрипции для мРНК были согласно рекомендациям производителя, для микроРНК775A: инкубация смеси при 16°C – 30 мин, 42°C – 30 мин, 85°C – 5 мин [10].

Полимеразная цепная реакция в реальном времени. Полимеразную цепную реакцию с генспецифичными праймерами проводили с помощью набора реактивов AmpliSence (Хеликон, Россия). Референсным геном выступал ген *EF-1A* фактора элонгации [11]. Нуклеотидный состав праймеров:

- для микроРНК775А: прямой – 5'-CACTGATTTCGATGTCTAG-3'; обратный – 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3';

- для микроРНК165а: прямой – 5'-CACTGATCGGACCAGGCTTCA-3'; обратный – 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCC-3';

- для микроРНК159b: прямой – 5'-ACCTGGCGTTTGGATTGAAG-3', обратный 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'.

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

УФ-модификация Sephadex<sup>R</sup> G-75. Для проведения модификации Sephadex<sup>R</sup> G-75 предварительно инкубировали в 20 mM Трис-НCl, pH 7,4 в соотношении 1:10 по массе в течение 8 часов. Модификацию Sephadex<sup>R</sup> G-75 для присоединения dATФ под воздействием УФ-облучения проводили на трансиллюминаторе SERVA BlueCube 300 (SERVA, Тайвань). Длина волны УФ-света составляла 312 нм, интенсивность света составляла 0.585 мВт/см<sup>2</sup>.

ИК-спектроскопический анализ. ИК-Фурье-спектры образцов исходных коммерческих образцов Sephadex<sup>R</sup> G-75 (Pharmacia, Uppsala, Sweden), аденозинтрифосфорной кислоты (dATФ, ЗАО Евроген, Москва), а также полученных комплексов Sephadex<sup>R</sup> G-75-dATФ и Sephadex<sup>R</sup> G-75-dATФ с комплементарной последовательностью к микро РНК775А с карбокси-Х родамином (ROX) на 3'-конце - были получены на спектрометре Bruker Alpha, оснащенном детектором на основе дейтерированного триглицинсульфата в матрице KBr, содержащие около 2% материала по массе. Измерения проводились в диапазоне от 400 до 4000 см<sup>-1</sup> с разрешением по волновому числу 4 см<sup>-1</sup>, а данные представлены как среднее значение 16 сканирований для каждого образца.

Спектрофотометрический анализ. Анализ спектров поглощения dATФ и се-

фадекса Sephadex<sup>R</sup> G-75-dATФ проводили в водном растворе в разбавлении 1:1000 на спектрофотометре Thermo Scientific Evolution 260 BIO (Thermo Scientific, USA, Madison). Изучение спектра поглощения проводили в диапазоне 190-300 нм со скоростью сканирования 1200 нм/мин. Обработку данных осуществляли с помощью программного обеспечения Thermo Insight 2.5 (Thermo Scientific, USA, Madison).

Статистическая обработка данных. Опыты проводили в трех биологических и четырех аналитических повторностях. Данные были подвергнуты двустороннему дисперсионному анализу (ANOVA) с использованием программного обеспечения для анализа данных STATISTICA версии 9.0 (Statsoft Wipro, USA). Результаты представлены в виде средних значений и стандартных отклонений (SD). Обсуждаются статистически значимые различия при P < 0.05 [12].

### Обсуждение результатов

Модификация Sephadex<sup>R</sup> G-75. Для получения универсальной «базы» для присоединения специфического лиганда к микроРНК775А Sephadex<sup>R</sup> G-75 был модифицирован путём присоединения dATФ под воздействием УФ-излучения согласно разработанному нами протоколу. К равному объёму Sephadex<sup>R</sup> G-75 добавили равный объём 2 mM раствора dATФ и перемешали. Инкубировали 30 минут при +4°C. Распределили смесь тонким слоем на кварцевом стекле и облучали УФ-лампой (312 нм) 2 минуты, затем смесь перемешали. Процедуру повторили 3 раза. Полученную смесь промыли трижды водой, отфильтровывая её каждый раз через бумажную воронку. Полученный модифицированный сефадекс хранили при +4°C.

Для получения аффинного сорбента, специфично связывающего микроРНК775А, к полученному модифицированному Sephadex<sup>R</sup> G-75-dATФ путем

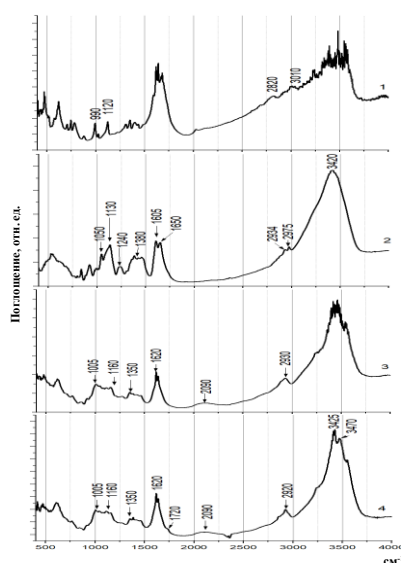


Рис. 1. Приведены ИК-спектры Sephadex<sup>R</sup> G-75 (1), аденозинтрифосфорной кислоты dATФ (2), продукта взаимодействия dATФ и Sephadex<sup>R</sup> G-75 под воздействием УФ облучения (3) и Sephadex<sup>R</sup> G-75 (М.) (4).

Fig. 1. IR spectra of Sephadex<sup>R</sup> G-75 (1), adenosine triphosphate dATP (2), a product of the interaction of dATP and Sephadex<sup>R</sup> G-75 under UV irradiation (3) and Sephadex<sup>R</sup> G-75 (M.) (4) are shown.

лигазной реакции присоединили комплементарную последовательность к соответствующей микроРНК: (последовательность зонда). К 200 мкл Sephadex<sup>R</sup> G-75-dATФ добавили 40 мкл 10х буфера для лигирования, 3 мкл Т4-лигазы, 50 мкл разбавленного в 20 раз лиганда и 107 мкл стерильной воды. Инкубировали полученную смесь 1 час при комнатной температуре. Полученный аффинный сорбент Sephadex<sup>R</sup> G-75 (М) хранили при +4°C.

ИК-спектроскопический анализ продуктов взаимодействия Sephadex<sup>R</sup> G-75 с dATФ. На рисунке 1 приведены ИК спектры исходного Sephadex<sup>R</sup> G-75 (спектр 1), аденозинтрифосфорной кислоты dATФ (спектр 2), продукта взаимодействия dATФ и Sephadex<sup>R</sup> G-75 под воздействием УФ облучения (спектр 3) и Sephadex<sup>R</sup> G-75 (М) (спектр 4). Из приведенных спектров можно сделать предположение, что в результате воздействия УФ облучения произошла активация химических связей и произошло взаимодействие между молекулами dATФ и Sephadex<sup>R</sup> G-75. Так при сравнении спектров исход-

ных соединений и спектра продукта взаимодействия dATФ и Sephadex<sup>R</sup> G-75 (рис.1 спектр 3) можно наблюдать изменение интенсивности пиков в области 1300-1200 см<sup>-1</sup>, связанное с растяжением С-О и Р-О. Пик при 1240 см<sup>-1</sup>, характерный для ассиметричных валентных колебаний Р-О связи в молекуле dATФ, исчезает в спектре продукта взаимодействия dATФ с Sephadex<sup>R</sup> G-75. Исчезновение пика при 1240 см<sup>-1</sup> может указывать на формирование эфирной связи Р-О-С между фосфатным остатком молекулы dATФ и гидроксильной группой Sephadex<sup>R</sup> G-75. На образование новой химической связи также указывает сужение пика в диапазоне частот от 1650 до 1600 см<sup>-1</sup>, характерном для изгиба N-H связи в аминогруппе пуринового кольца молекулы dATФ. На спектре dATФ пик в этом диапазоне имеет выраженный дублет с максимумами при 1605 и 1650 см<sup>-1</sup>. Наличие дублета в этом диапазоне связано со взаимодействием аминогруппы аденина с другими функциональными группами молекулы (например, фосфатами) или водородными связями, с которыми связаны

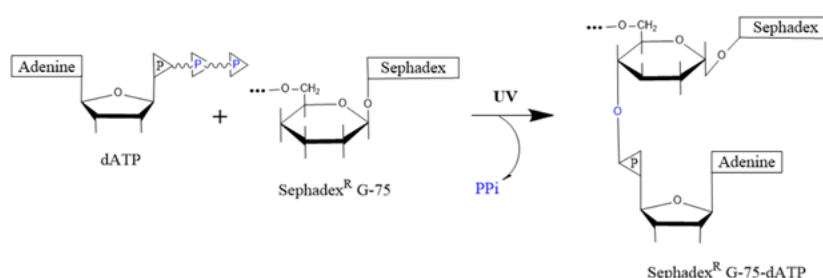


Рис. 2. Гипотетическая схема взаимодействия Sephadex<sup>R</sup> G-75 с dATФ  
Fig. 2. Hypothetical interaction scheme of Sephadex<sup>R</sup> G-75 with dATФ

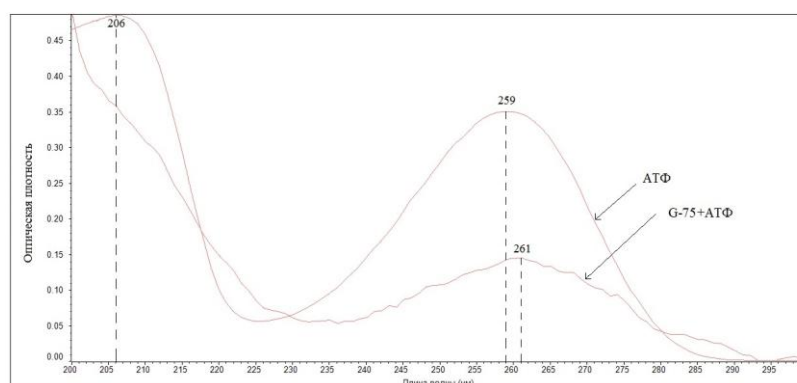


Рис. 3. Спектр поглощения dATФ и сепхадекса Sephadex<sup>R</sup> G-75-dATФ в водном растворе в разбавлении 1:1000 в диапазоне 190-300 нм.

Fig. 3. Absorption spectrum of dATФ and Sephadex<sup>R</sup> G-75-dATФ in an aqueous solution at a dilution of 1:1000 in the range of 190-300 nm.

конформационным изменениям в молекуле dATФ. Сужение этого пика на спектре 3 может быть обусловлено изменением гибкости и конфигурации молекулы dATФ в результате взаимодействия с функциональными группами Sephadex<sup>R</sup> G-75. Схема взаимодействия dATФ с сепхадексом показана на рис. 2.

На формирование комплекса Sephadex<sup>R</sup> G-75-dATФ также указывает изменение профиля спектра в области 1100-850 см<sup>-1</sup>, характерной для растяжения связи С-О при формировании эфирной связи с участием гидроксильной группы пиранозы декстрана.

Наличие свободной ОН-группы рибозы в составе dATФ, связанной с Sephadex<sup>R</sup> G-75 фосфоэфирной связью, дало возможность проведения лигазной реакции с комплементарной последовательности с ROX на 3'-конце.

Следует отметить отсутствие значимых изменений в профиле спектра Sephadex<sup>R</sup> G-75 (М) (рис. 1, спектр 4) при

сравнении со спектром Sephadex<sup>R</sup> G-75-dATФ (рис. 1, спектр 3). Это может быть связано с формированием родственных химических связей в молекулах Sephadex<sup>R</sup> G-75 (М) [13]. Однако на наличие родамина в структуре комплекса Sephadex<sup>R</sup> G-75 (М) может указывать появление небольшого плеча при 1720 см<sup>-1</sup>, которому соответствует растяжение С=О связи в молекуле родаминовой кислоты и небольшое изменение интенсивности частот в области 1100-1070 см<sup>-1</sup>, соответствующая валентным колебаниям связи -С-О-С- в углеводном кольце [14].

Спектрофотометрический анализ продуктов взаимодействия Sephadex<sup>R</sup> G-75 с dATФ. На рис. 3 приведены УФ спектры аденозинтрифосфорной кислоты dATФ (спектр 1) и продукта взаимодействия dATФ и Sephadex<sup>R</sup> G-75 (спектр 2) после воздействия УФ облучения. Из приведенного спектра видно, что характерный максимум поглощения фосфатных групп

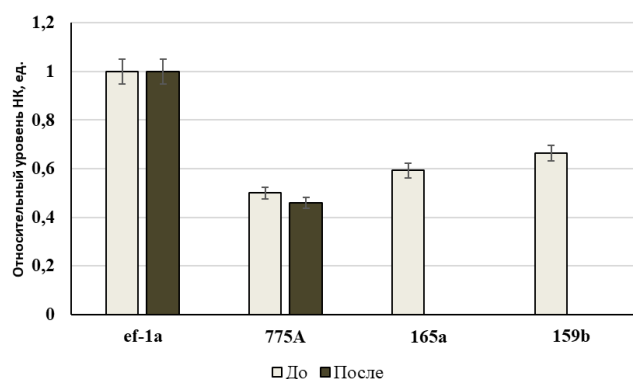


Рис. 4. Содержание микроРНК до и после аффинной хроматографии с применением модифицированного сорбента на основе Sephadex<sup>R</sup> G-75. ef-1a – референсный ген, фактор элонгации EF-1A, 775A – микроРНК775A, 165a – микроРНК775A65a, 159b – микроРНК159b.

Fig. 4. MicroRNA content before and after affinity chromatography using a modified sorbent based on Sephadex<sup>R</sup> G-75. ef-1a – reference gene, elongation factor EF-1A, 775A – microRNA775A, 165a – microRNA775A65a, 159b – microRNA159b.

АТФ при 206 нм испытывает гипохромный эффект, что указывает на участие фосфатных групп dATФ в образовании химических связей. Кроме того, обращает внимание, что максимум поглощения пуринового кольца dATФ при длине волны равной 259 нм, смещается в сторону более длинных длин волн (батохромный сдвиг) в продукте взаимодействия Sephadex<sup>R</sup> G-75 с dATФ. Полученные результаты указывают на успешную модификацию исходного Sephadex<sup>R</sup> G-75 путем присоединения dATФ при воздействии УФ облучения.

Аффинная хроматография микроРНК775A с применением модифицированного Sephadex<sup>R</sup> G-75. Для получения очищенного препарата микроРНК775A использовали в качестве хроматографической колонки инсулиновый шприц на 0,1 мл. Колонку заполнили полученным аффинным сорбентом ( $V=0.35 \text{ см}^3$ ) на основе Sephadex<sup>R</sup> G-75, в качестве элюента использовали стерильную воду. 30 мкл пробы суммарной РНК, выделенной из растительного материала, нанесли на колонку. Пропустили 200 мкл элюента, собрали фракцию, содержащую несвязанные РНК. Колонку промыли 200 мкл 500 мМ NaCl и собрали фракцию, содержащую

микроРНК775A. К полученному препарату добавили равный объем 70% этилового спирта, центрифугировали 5 минут при 13 000 об/мин, осадок растворили в 50 мкл стерильной воды.

Для подтверждения связывания микроРНК с лигандом и дальнейшей её очистки провели ряд исследований с применением ПЦР в реальном времени. Во-первых, оценили количественное содержание нескольких микроРНК (микроРНК775A, микроРНК165/166, микроРНК159) в образце с суммарной РНК, выделенной из растительного материала. Во-вторых, после проведения аффинной хроматографии оценили количественное содержание микроРНК в полученном препарате с предполагаемой очищенной микроРНК775A. Результаты ПЦР в реальном времени показали, что в полученной фракции присутствует только микроРНК775A, в то время как микроРНК165a и микроРНК159b не были обнаружены (рис. 4).

В исходном образце с суммарной РНК количество микроРНК775A составило 0.5 отн.ед. Полученный препарат после аффинной хроматографии содержал 0.46 отн.ед свободной микроРНК775A, следовательно, выход составил 92%.



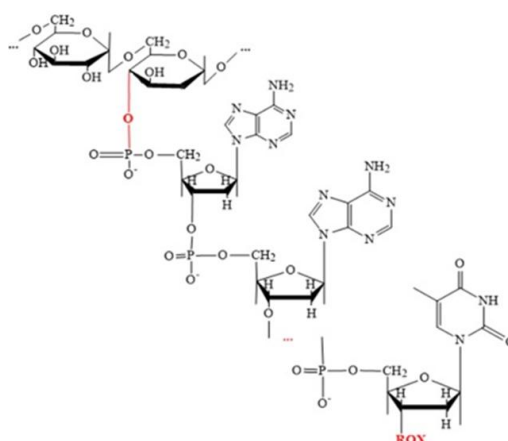


Рис. 5. Структура формирования УФ-модифицированного Sephadex<sup>R</sup> G-75 в присутствии dATФ и лигандом для микроРНК775А с указанием формируемой ковалентной связи.

Fig. 5. Structure of the modified UV-modified Sephadex<sup>R</sup> G-75 formation in the presence of dATФ and a ligand for microRNA775A, indicating the covalent bond formed

### Заключение

Применение УФ-модификации Sephadex<sup>R</sup> G-75 в присутствии dATФ способствовало образованию Р-О связей, что находит отражение в изменении соответствующих связей немодифицированных компонентов при проведении ИК-спектроскопии. Наличие свободной ОН-группы рибозы в составе dATФ, связанного с Sephadex<sup>R</sup> G-75, дает возможность проведения лигазной реакции с олигонуклеотидной последовательностью с ROX на 3'-конце (рис. 5). Использование в качестве олигонуклеотидного лиганда для присоединения к свободной 3'-ОН-группы рибозы в составе dATФ, комплементарной последовательности к микроРНК775А позволяет обеспечить формирование аффинной структуры для ее последующего выделения, способствуя не только специфической преципитации микроРНК, но и дополнительной ее очистке от ДНК. Это имеет важное значение в последующем качественном и ко-

личественном анализе микроРНК методом ПЦР, поскольку присутствие иных нуклеиновых кислот в анализируемом образце может приводить к формированию нецелевых ампликонов и, как следствие, снижению эффективности всего анализа.

УФ-модификации Sephadex<sup>R</sup> G-75 в присутствии dATФ с последующим легированием лиганда для микроРНК775А, позволила применить данный метод для выделения анализируемой микроРНК из общей мРНК клеток листьев кукурузы. Разработанный метод аффинной хроматографии для микроРНК775А на основе Sephadex<sup>R</sup> G-75 и dATФ позволила получить ее гомогенный препарат с эффективностью выделения 92%.

### 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.

3. Thakor N., Holcik M. *InTech*. 2012: 145-164. <https://doi.org/10.5772/34061>

4. Rodriguez E.L., Poddar S., Iftexhar S., Suh K., Woolfork A.G., Ovbude S., Pekarek A., Walters M., Lott S., Hage D.S. *Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2020; 1157: 122332. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122332>

### Список литературы/References

1. Verwoerd T.C., Dekker B.M., Hoekema A. *Nucleic Acids Res*. 1989; 17: 2362. <https://doi.org/10.1093/nar/17.6.2362>
2. Shishkina G., Levina A.S., Zarytova V.F. *Chem. Reviews*. 2001; 70: 509-533. <https://doi.org/10.1070/rc2001v070n06abeh000640>



5. Principles and methods of biochemistry and molecular biology: a textbook / edited by K. Wilson, J. Walker; translated from English by T.P. Mosolova, E.Yu. v 3rd ed. – Moscow: Knowledge Laboratory, 2020. 855 p.
6. Chomczynski P., Sacchi N. *Anal. Biochem.* 1987; 162: 156-159. <https://doi.org/10.1006/abio.1987.9999>
7. Fedorin D.N., Khomutova A.E., Eprintsev A.T., Igamberdiev A.U. *Int. J. Mol. Sci.* 2025; 26: 865. <https://doi.org/10.3390/ijms26030865>
8. Fedorin D.N., Eprintsev A.T., Chuykova V.O., Igamberdiev A.U. *Int. J. Mol. Sci.* 2024; 25: 5733. <https://doi.org/10.3390/ijms25115733>
9. Chuykova V.O. *Organization and regulation of physiological and biochemical processes.* 2023; 25: 316-321.
10. Kramer M.F. *Curr Protoc Mol Biol.* 2011. CHAPTER: Unit15.10.
11. Nicot N., Hausman J.F., Hoffmann L., Evers D. *J Exp Bot.* 2005; 56(421): 2907-2914. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri285>
12. Lakin G.F. *Biometry.* Moscow: Vyssh. shk., 1990. 351 p. (In Russ.)
13. Laboratory practical training on the genetics of microorganisms: guidelines / O.K. Davydova, I.V. Gryazeva; Orenburg State University. – Orenburg: OSU, 2013. 53 p. (In Russ.)
14. Zhizhina G.P., Oleynik E.F. *Usp. chem.* 1972; 41: 474-511. (In Russ.)

### 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

**А.Е. Хомутова** – бакалавр кафедры биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

**Е.В. Хомутова** – директор Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт физико-органической химии и углеродной химии им. Л.М.Литвиненко», к.б.н., ДНР, г. Донецк, 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

**A.E. Khomutova** – Bachelor of the Department of Biochemistry and Cell Physiology, Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation

**E.V. Khomutova** – director of the Institute of Physical-Organic Chemistry and Coal Chemistry named after L.M. Litvinenko, Candidate of Biological Sciences, DPR, Donetsk, Russian Federation

*Статья поступила в редакцию 11.09.2025; одобрена после рецензирования 19.11.2025; принята к публикации 26.11.2025.*

*The article was submitted 11.09.2025; approved after reviewing 19.11.2025; accepted for publication 26.11.2025.*