

## ПРОСТОЙ МАЛОЗАТРАТНЫЙ МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ РНК ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО МАТЕРИАЛА

Выделение и очистка тех или иных биологических молекул – неотъемлемая составляющая для целого ряда молекулярно-биологических экспериментов. Получение недеградированной, очищенной от примесей РНК – важный исходный этап, успешное преодоление которого определяет возможности дальнейшего применения полученной РНК. Чаще всего очищенную РНК используют для изучения характера экспрессии генов, а также для детекции ряда молекулярно-генетических событий с использованием метода РТ-ПЦР.

В течение длительного периода изучения нуклеиновых кислот было разработано достаточно много методов выделения РНК и ДНК. Вопросу разделения РНК и ДНК при очистке нуклеиновых кислот уделялось особое внимание после выяснения различий в их свойствах. В 1951 г. впервые был предложен метод выделения РНК с использованием гуанидинхлорида – хаотропного агента, препятствующего разрушению выделяемой РНК нуклеазами [1]. Спустя пять лет был дан старт использованию фенола в методиках разделения белков и нуклеиновых кислот [2]. В 1977 г. впервые было предложено использование гуанидинтиоцианата в качестве более эффективной замены гуанидинхлорида [3]. Весьма успешными оказались первые попытки комбинированного использования фенола и гуанидинтиоцианата [4].

Многие из предложенных методов уже давно не используются по причинам дороговизны либо длительности очистки. К примеру, сейчас уже не используются методы очистки РНК с применением ультрацентрифугирования в градиенте плотности хлорида цезия [5]. Этот популярный ранее метод требовал длительного времени центрифугирования. Ряд других методик нуждаются в применении охлаждаемой центрифуги. Поэтому основную часть методов выделения РНК составляют методы, основанные на применении тех или иных модификаций так называемого «гуанидин-тиоцианат-фенол-хлороформного» мето-

да [5, 6], который был впервые предложен более 20 лет назад и не утратил своей актуальности и по сегодняшний день. В качестве основы многих коммерческих наборов для выделения РНК (такие, как TriZol, TRI Reagent и пр.) используются модификации этого метода. В данной работе предложен новый оригинальный вариант модификации этого, уже ставшего классическим, метода.

### Материалы и методы

Выделение РНК из свежих молодых листьев табака *Nicotiana tabacum* L., а также из замороженных стеблей мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. осуществляли с использованием трех разных методических подходов, а именно:

С использованием коммерческого набора Tri Reagent (Sigma-Aldrich, США);

С использованием коммерческого набора GeneGET mini prep Kit (выделение на колонках) (Thermo Scientific, США);

С помощью оригинального собственного метода, основанного на использовании гуанидинтиоцианат-фенол-хлороформного метода [5] с определенными модификациями.

В последнем случае в состав реагента для выделения РНК входили фенол – 40 % (объемная доля), глицерол – 4 % (объемная доля), гуанидинтиоцианат – 0,8 моль/л (94,5 г/л), ацетат натрия – 0,1 моль/л (8,2 г/л). Для приготовления реагента соль и глицерол растворяли в воде, а затем добавляли теплый фенол, расплавленный на водяной бане при температуре 50°C. Полученный реактив необходимо хранить при 4°C в темном месте (во избежание окисления фенола) не более 2 недель. В случае приобретения раствором для выделения РНК розовой окраски (за счет появления продуктов окисления фенола) его уже не следует использовать. Непосредственно перед выделением РНК pH раствора необходимо довести до 4,5 с помощью ледяной уксусной кислоты.

В дальнейшем для выделения РНК в соответствии с предложенным методом 100 мг рас-

тительной ткани растирали в жидком азоте, добавляли 1 мл готового раствора для выделения РНК (рН 4,5), тщательно перемешивали до гомогенного состояния, после чего раствор еще раз энергично перемешивали в течении 15 с и оставляли при комнатной температуре на 5 мин. После этого добавляли 0,3 мл хлороформа, тщательно перемешивали до состояния суспензии в течение 15 с и центрифугировали в течение 5 мин при 10000g. Затем верхнюю водную фазу (примерно 0,5 мл) переносили в новую пробирку, добавляли равный объем 99 % изопропанола для преципитации, перемешивали переворачиванием 15 с и оставляли для осаждения на 10 мин при комнатной температуре. Окончательно преципитацию осуществляли путем центрифугирования при 10000g в течение 5 мин, надосадочную жидкость удаляли. К оставшемуся на дне полупрозрачному осадку, содержащему РНК, добавляли 0,3 мл 70 %-ного этилового спирта, тщательно перемешивали переворачиванием или с помощью вортекса, центрифугировали при 10000g в течение 2 мин. Надосадочную жидкость аккуратно убрали, осадок подсушивали от спирта при комнатной температуре и растворяли в 50 мкл воды, обработанной диэтилпирикарбонатом.

Следует отметить, что все этапы выделения, кроме гомогенизации, проводили при комнатной температуре. На первом этапе гомогенизацию тканей осуществляли прямо в пробирках типа Ерpendorf, наполовину погруженных вертикально в жидкий азот. Как альтернативу можно применять предварительно охлажденные жидким азотом ступки с последующим перемещением полученной растительной массы в виде пудры в пробирки. Полученная путем осаждения РНК обычно слабо заметна и представляет собой слабо опалесцирующий полупрозрачный осадок. В случаях, когда количество исходной растительной ткани не превышает 20 мг, осадок РНК может быть и вовсе незаметен.

Концентрацию РНК, полученную с помощью трех различных методов, определяли спектрофотометрически. Также для первичного контроля ее качества использовали электрофорез в 1,5 %-ном агарозном геле, при этом количество наносимой пробы составляло 1/5 (приблизительно 10 мкл) от объема выделенного образца. Перед нанесением на гель пробу предварительно смешивали с красителем (раствор бромфенолового синего).

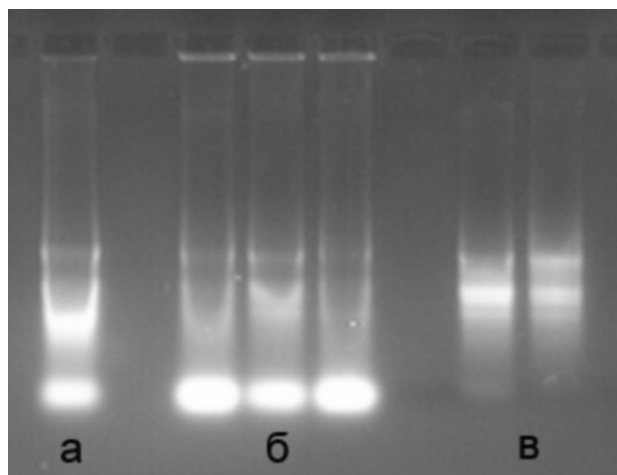
В дальнейшем выделенную РНК пшеницы использовали для получения кДНК с помощью

коммерческого набора *REVERTA-L* (ИнтерЛаб-Сервис, Россия). Перед проведением обратной транскрипции концентрацию РНК во всех образцах выравнивали. Затем проводили ПЦР в режиме реального времени для определения качества РНК, а также оценки эффективности ПЦР, поскольку качество самой РНК и наличие ингибиторов, загрязняющих РНК, могут сильно влиять на эффективность ПЦР. С помощью ПЦР в режиме реального времени были амплифицированы фрагменты генов убихитина пшеницы.

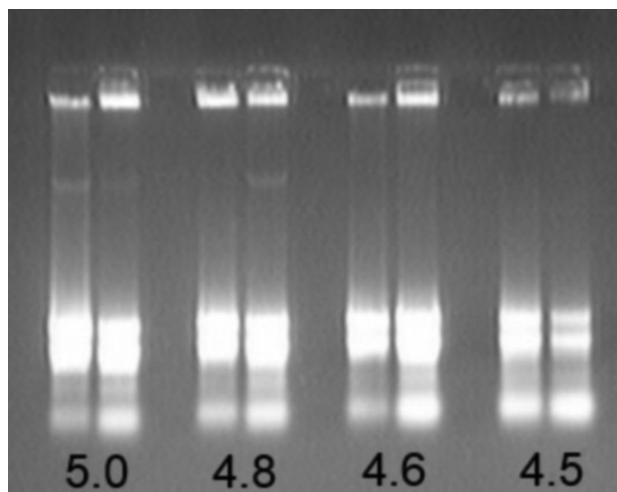
### Результаты и обсуждение

Электрофореграммы образцов РНК, выделенной с помощью трех рассматриваемых нами методов, представлены на рис. 1. Коммерческий набор *Tri Reagent* был взят для сравнения, поскольку его преимуществом является возможность произвольно масштабировать объемы используемых реактивов в зависимости от количества исходного материала. Следует отметить заметное качественное сходство между электрофореграммами РНК, выделенной с помощью *Tri Reagent* и с помощью предложенного нами метода, что можно объяснить схожестью химических компонентов, используемых в случае обоих методов. Для сравнения также приведены результаты получения РНК с помощью *GeneGET mini rper Kit*, представляющего собой одно из наиболее оптимальных решений с учетом соотношения цена/качество РНК (рассчитан на 50 выделений РНК из растительного материала). В целом полученные результаты свидетельствуют в пользу того, что с помощью предложенного нами метода из растительного материала удастся выделить РНК, сопоставимую по качеству с образцами, получаемыми с помощью лучших предлагаемых коммерческих методов.

Во всех случаях на полученных электрофореграммах отсутствует заметная контаминация проб ДНК. Уровень примесей ДНК в пробах РНК уменьшался со снижением значений рН реагента (фенол-гуанидинтиоцианат) при использовании предложенного метода (рис. 2). При значении рН 4,5 отсутствуют видимые признаки присутствия ДНК, а проверка наличия ДНК с помощью прямой ПЦР также не выявила такого загрязнения. Однако было показано, что со снижением значений рН постепенно падает выход РНК, а при значениях рН ниже 4,5 происходит резкое падение этого показателя, и в первую очередь исчезает высокомолекулярная РНК. Таким образом, подбор оптимального значения рН является



**Рис. 1.** Электрофореграммы РНК табака *N. tabacum*, выделенной с помощью разных методов: а – Tri Reagent; б – метод, предложенный авторами; в – GeneGET mini prep Kit



**Рис. 2.** Электрофореграммы РНК пшеницы *T. aestivum*, выделенной с помощью предложенного метода при различных значениях рН реагента (значения рН указаны в нижней части рисунка)

ся очень важным этапом при выделении РНК. Обычно для получения значений 4,5–4,6 пришлось использовать 20 мкл ледяной уксусной кислоты на 1 мл раствора реагента. Выход РНК при значении рН 4,5 составлял 15–20 мкг/мл, а при значении рН 5 – 40–45 мкг/мл, однако в этом случае рекомендуется использовать обработку ДНКазой из-за наличия небольшой примеси геномной ДНК, что визуализируется на электрофореграммах (рис. 2).

После получения кДНК с использованием *REVERTA-L* была проведена ПЦР в режиме ре-

ального времени. Были получены очень схожие результаты для РНК, выделенной с помощью оригинального метода и с использованием Tri Reagent (среднее значение  $C_t$  для гена убихитина имело значение 19,2 в случае использования предложенного нами метода и 18,8 при использовании набора Tri Reagent соответственно). В случае использования GeneGET mini prep Kit значение  $C_t$  равнялось 17,9. Эффективность реакции во всех случаях была близка к 100 %.

Следует отметить основные отличия предложенного метода от классического гуанидин-тиоцианат-фенол-хлороформного метода выделения РНК. Концентрация самого дорогого компонента реагента, используемого для выделения РНК, – гуанидин тиоцианата – снижается в 5 раз: с 4 М/л до 0,8 М/л. Сам протокол выделения значительно упрощен, для его осуществления не требуется центрифуга с охлаждением. Также на выделение РНК требуется всего около 40 мин (против 3 ч при использовании классического метода [5]). Исходя из полученных результатов исследований (выход РНК, применимость для РТ-ПЦР), предложенный метод изолирования РНК весьма схож с методом с применением набора Tri Reagent. В предложенном нами варианте также существует возможность произвольного масштабирования количества реагентов в зависимости от количества исходного материала. Недостатком предложенного метода является недолговечность приготовленного реагента (около 2 недель и несколько дней после доведения рН реагента до значения 4,5), что приводит к необходимости частого приготовления новых небольших его порций, что предусматривает плавление фенола.

## Выводы

Основными преимуществами предложенного метода являются простота протокола выделения РНК и его относительная дешевизна в пересчете на одно выделение, основными недостатками – непродолжительные сроки хранения готовых растворов и более низкая долговечность выделенной РНК при сравнении с другими методами. Однако, если выделенная РНК сразу используется для дальнейших этапов исследований, например, для таких, как получение кДНК и проведение ПЦР, то не было обнаружено каких-либо отрицательных проявлений, сказывающихся на качестве получаемых результатов. Выход получаемой таким способом РНК достаточен и находится на уровне, который могут предложить коммерческие наборы.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Volkin E., Carter C.E. The preparation and properties of mammalian ribonucleic acids // J. Am. Chem. Soc. – 1951. – 73, № 4. – P. 1516–1519.
2. Kirby K.S. A new method for the isolation of ribonucleic acids from mammalian tissues // Biochem. J. – 1956. – 64. – P. 405–408.
3. Ullrich A., Shine J., Chirgwin J., Pictet R., Tischer E., Rutter W.J., Goodman H.M. Rat insulin genes: construction of plasmids containing the coding sequences // Science. – 1977. – 196. – P. 1313–1319.
4. Feramisco J.R., Smart J.E., Burridgel K., Helfmanll D.M., Thomas G.P. Co-existence of vinculin and a vinculin-like protein of higher molecular weight in smooth muscle // J. Biol. Chem. – 1982. – 257, № 18. – P. 11024–11031.
5. Chomczynski P., d Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction // Anal. Biochem. – 1987. – 162, № 10. – P. 156–159.
6. Chomczynski P., Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on // Nature Protocols. – 2006. – 1, № 2. – P. 581–585.

## BUY D.D., PIRKO YA.V., BLUME YA.B.

*Institute of Food Biotechnology and Genomics,*

*Ukraine, 04123, Kyiv, Osypovskiyi str., 2A, e-mail: denisbuy90@gmail.com*

### SIMPLE AND CHEAP METHOD OF RNA ISOLATION FROM PLANT MATERIAL

**Aim.** RNA isolation is the first essential step for molecular biological experiments. Number of different chemical methods of RNA extraction and purification are known. Even so, the high cost and complexity of many of these methods is an obstacle to their use in the regular laboratory practice. A new cheap modified method of RNA isolation is proposed.

**Methods.** RNA isolation was conducted out using three different methods of extraction, including proposed by authors. Electrophoresis of obtained RNA samples was done. RNA, isolated from wheat *Triticum aestivum*, was used for real-time RT-PCR amplification of ubiquitin gene. **Results.** Proposed method of RNA extraction allows isolate RNA, which is good enough to be used in RT-qPCR. RNA electrophoregrams in this case are similar to those, obtained with usage of commercial kits. The yield of RNA reaches 15–20 µg from 100 mg of plant tissue (leaf). **Conclusions.** The main advantages of proposed method are low cost and simple fast protocol. The main disadvantage is low stability of ready solution, resulting in frequent need to prepare a new one.

**Keywords:** RNA isolation, guanidinium thiocyanate.