

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОГО МЕТОДА ВЫДЕЛЕНИЯ МИКРОРНК ИЗ СПИННОМОЗГОВОЙ ЖИДКОСТИ ЧЕЛОВЕКА

И.А. Байчурин, А.А. Костенников, Я.О. Мухамедшина

1 – Казанский (Приволжский) федеральный университет, 420008, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Кремлевская, д.18

Baich.rina@mail.ru

Травма спинного мозга (ТСМ) возникает вследствие повреждение позвоночника и может приводить к нарушениям чувствительной, двигательной или вегетативной функций. Считается, что изменения экспрессии генов, связанные с процессами, запускаемыми ТСМ, сопровождаются посттранскрипционной регуляцией генов. Среди известных посттранскрипционных регуляторов наибольшее значение имеют микроРНК. МикроРНК – класс коротких некодирующих РНК длиной около 22 нуклеотидов. МикроРНК стабильны во всех биологических жидкостях, а также являются тканеспецифичными молекулами, что делает их привлекательными кандидатами в качестве неинвазивных биомаркеров для оценки тяжести травмы и динамики восстановления. Поскольку концентрация микроРНК в спинномозговой жидкости низкая, их экстракция является сложной задачей. Целью работы было определение наиболее эффективного метода получения микроРНК из спинномозговой жидкости человека.

Спинномозговая жидкость была получена от пациентов в острый период ТСМ при их поступлении в нейрохирургическое отделение №2 Республиканской клинической больницы (Казань, Россия). Образцы спинномозговой жидкости объемом 2-3 мл были взяты с помощью люмбальной пункции. Тотальную РНК выделяли из 1,5 мл ликвора с помощью коммерческих наборов: Quick-RNA Microprep kit, Quick-RNA Miniprep kit, mirVana PARIS, miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit и TRIzol LS Reagent. Количество и качество полученной РНК оценивали с помощью флуориметра Qubit 2.0 и микрофлюидного электрофореза на приборе Bioanalyzer 2100. Содержание микроРНК в образцах с тотальной РНК определяли с помощью набора реагентов Bioanalyzer Small RNA kit. Статистический анализ данных выполняли с помощью пакета Microsoft Excel.

В работе было установлено, что наименьший выход тотальной РНК и микроРНК из спинномозговой жидкости наблюдался при использовании наборов mirVana PARIS и miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit. Наибольший выход РНК отмечен в образцах, полученных с помощью Quick-RNA Microprep kit, Quick-RNA Miniprep kit и TRIzol LS Reagent. Наиболее эффективным методом получения тотальной РНК и микроРНК из ликвора был признан модифицированный нами метод фенол-хлороформной экстракции с применением реагента TRIzol LS Reagent. Концентрация тотальной РНК, полученной с помощью TRIzol LS Reagent была на 20% больше, чем при выделении с помощью Quick-RNA Miniprep kit и в 2 раза больше, чем при использовании Quick-RNA Microprep kit. Количество микроРНК после экстракции TRIzol LS Reagent было в 2 раза больше по сравнению с образцом, полученным Quick-RNA Miniprep kit.

Полученные в ходе первого этапа работы образцы микроРНК будут использованы для поиска биомаркеров степени повреждения при ТСМ с помощью секвенирования и количественной ПЦР.

Работа проведена при поддержке гранта РФФИ (проект №20-315-70028). Работа частично профинансирована за счет субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету на Государственное задание в сфере научной деятельности 0671-2020-0058.