

**СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ВЫДЕЛЕНИЯ РНК МЕТОДИКАМИ
«RNEASY MINI KIT QIAGEN» И «РИБО-ЗОЛЬ-D» ДЛЯ ПОСЛЕДУЮЩЕГО
АНАЛИЗА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕХНОЛОГИИ «БИОЧИП»**

Шевчук Д.В., Ануфриева Е.Е.,

Научные руководители – канд. биол. наук, доцент Т. Н. Субботина, канд. биол. наук Гусейнов О.А., канд. мед. наук Ольховский И.А.

Сибирский федеральный университет

Красноярский филиал гематологического научного центра Минздрава России

Лейкоз – гетерогенное злокачественное заболевание, опухоль кроветворной системы, возникающая в костном мозге. Злокачественные заболевания являются второй по распространенности причиной смертности в современном мире, наряду с сердечно-сосудистыми заболеваниями. Как и многие другие опухолевые процессы, возникновение лейкоза ассоциировано с появлением генетических нарушений, а именно, хромосомных транслокаций.

Реципрокные транслокации – это обмен участками между негомологичными хромосомами. Такой тип хромосомных аберраций может иметь два последствия: перестройка затрагивает либо регуляторные элементы генов, либо их кодирующие части. В первом случае изменяется экспрессия нормального гена, а во втором случае - образуется химерный (слитый) ген, что приводит к экспрессии химерной мРНК и, как следствие, химерного белка с измененными свойствами. Такие продукты химерных генов (мРНК и белки) могут служить маркерами злокачественных клеток.

Технология «ЛК-Биочип» активно используется для выявления 13 основных хромосомных транслокаций при острых и хронических лейкозах (<http://www.biochip.ru/technology/index.html>).

Биологический микрочип представляет собой подложку из стекла или пластика, на которую нанесена микроматрица, ячейки которой содержат олигонуклеотиды, комплементарные химерным генам. Содержащие флуоресцентную метку ампликоны специфически связываются с олигонуклеотидами на матрице; флуоресцентный сигнал позволяет визуализировать результат. Анализ включает следующие основные этапы: получение к-ДНК методом обратной транскрипции РНК, проведение 2-х раундовой ПЦР с полученной к-ДНК и последующую гибридизацию продукта 2-го раунда ПЦР на биологическом микрочипе.

Данная методика достаточно трудозатратна, продолжительна по времени и требовательна к качеству выделенной РНК. Присутствие в пробе выделенной РНК остатков геномной ДНК может значительно ухудшить проведение методик с обратной транскрипцией, возможно связывание ДНК с праймерами и, тем самым, получение неспецифического сигнала гибридизации.

Целью нашей работы было сравнение эффективности двух методик выделения РНК для дальнейшего проведения анализа с использованием технологии «Биочип». РНК выделяли из клеток костного мозга пациентов, больных лейкозом, причем, одни образцы были выделены набором реагентов «Rneasy mini kit Qiagen», а другие – набором «Рибо-золь-D» с меркаптоэтанолом. Методика выделения РНК из костного мозга набором реагентов «Рибо-золь-D» заключается в предварительном лизисе клеток специфическим реагентом и последующим разделением на две фазы: верхняя (водная) фаза содержит РНК, а нижняя (фенольная) – белки и ДНК. Другая методика – с использованием реагентов «Qiagen» основана на отмывке РНК от примесей на специальных колонках.

Далее для оценки выделенной РНК на предмет наличия примесей ДНК проводился горизонтальный электрофорез в 1%-ном агарозном геле с использованием флуоресцентного красителя этидиума бромида. Для идентификации полос электрофореза была использована система маркеров и образец ДНК, относительно уровня которого и определялось наличие ДНК в пробах. Было выяснено, что в пробах, выделенных с использованием реагентов «Qiagen», полоса, соответствующая ДНК менее интенсивна, то есть, содержание ДНК в этих пробах ниже, чем в пробах, выделенных набором «Рибо-золь-D». На данной фореграмме представлены полученные результаты:

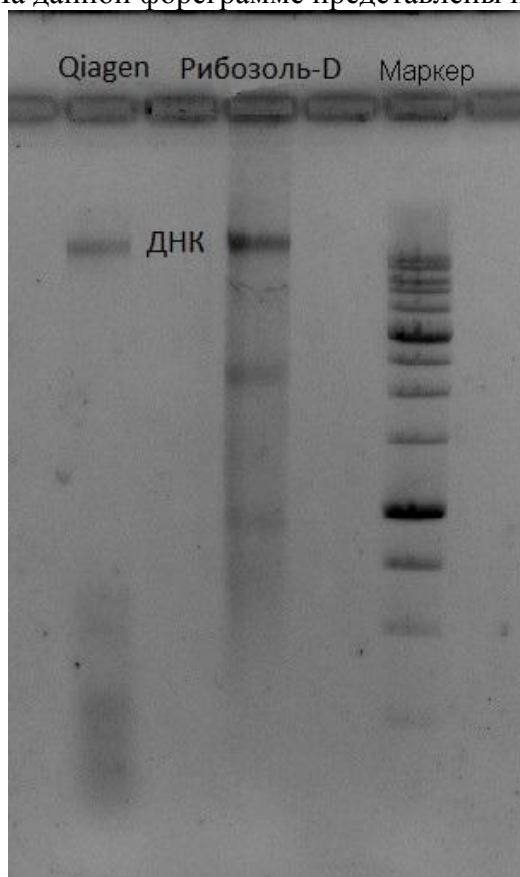


Рис.1 – Фореграмма образцов РНК, выделенных методиками «Qiagen» и «Рибо-золь-D».

Таким образом, было определено, что методика с использованием набора реагентов «Qiagen» оптимальнее для выделения РНК с последующим проведением обратной транскрипции в методике «ЛК-Биочип».