



УДК 577.2.08

## ПРОСТОЙ МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ РНК

© 1997 г. О. Г. Грибанов<sup>#</sup>, А. В. Щербаков, Н. А. Перевозчикова, В. В. Дрыгин, А. А. Гусев

Всероссийский научно-исследовательский институт защиты животных, 600900, Владимир-Юрвец

Поступило в редакцию 28.02.97 г. Принято к печати 26.05.97 г.

Стекловолоконистые фильтры GF/F (GF/C) использовали для выделения РНК клеток *E. coli*, клеток почек сирийского хомячка, вируса ящура и вируса болезни Ньюкасла. Показано, что в присутствии гуанидинтиоцианата (2 М) и этанола (изопропанола) (50%) РНК обратимо сорбируется на фильтрах и легко элюируется водой. Варьируя концентрацию гуанидинтиоцианата и спирта при сорбции и промывках, можно менять фракционный состав выделяемой РНК. Получаемые препараты нативной РНК сразу пригодны для проведения реакций обратной транскрипции и процедуры обратной транскрипции ПЦР.

*Ключевые слова:* РНК, выделение, стекловолоконистые фильтры.

Разработка основанных на молекулярно-биологических методах (ПЦР, ОТ-ПЦР, гибридизация и др.) диагностикумов возбудителей важнейших инфекционных заболеваний требует создания эффективных, дешевых и легко поддающихся автоматизации методик выделения нуклеиновых кислот.

В последнее время активно разрабатываются методы с использованием силикатных сорбентов. В основном эти методы касаются выделения ДНК [1–6], но, как было показано [7–9], силикатные сорбенты способны сорбировать и РНК. Необходимо отметить, что полученные данные несколько противоречивы. Р. Бум с соавт. [8, 9] показали, что силикагель или диатомы при высоких концентрациях гуанидинтиоцианата (GTC) одинаково эффективно сорбируют и ДНК, и рибосомные РНК, тогда как другие авторы указывают на то, что ДНК сорбируется на силикатных сорбентах при высоких концентрациях GTC (4 М) [6, 7], а РНК – при низких (1 М) [7].

В данной работе мы описываем выделение РНК с помощью стекловолоконистых микроцентрифужных фильтров GF (Whatman) из препаратов клеток или вирусов, разрушенных путем обработки GTC. Объектами для выделения РНК служили клетки *E. coli*; клетки ВНК-21; очищенные препараты ВБН; инфицированные ВБН куриные эмбрионы и ткани инфицированных кур; афтозная ткань, содержащая вирус ящура.

Простая инкубация вируса ящура в 1 М GTC с последующей сорбцией на стекловолоконистых

фильтрах обеспечивает выход РНК, сопоставимый с выходом, достигаемым при использовании метода Хомчинского и Сакчи [10] (набор RNAGents фирмы Promega (США)) или набора для выделения РНК фирмы Quiagen [7]. Однако данная методика не позволяет достичь высоких выходов РНК в случае сложных рибонуклеопротеидных комплексов (РНП), например при выделении РНК вируса болезни Ньюкасла, что, по-видимому, связано с недостаточной депротеинизацией РНК в присутствии 1 М GTC.

Для оптимизации процесса выделения мы исследовали влияние на нативность и выход РНК после сорбции следующих факторов: 1) концентрации GTC (1, 2, 3 и 4 М), а также концентрации GTC и этанола (изопропанола), используемых в процессе выделения (1, 2, 3, 4 М и 75, 50, 25, 0% соответственно); 2) прогрева пробы при 70°C и времени инкубации клеток с растворителями при комнатной температуре; 3) типа стекловолоконистого фильтра (GF/A, B, C, F), применяемого для сорбции. Таким образом было выяснено, что оптимальными условиями для выделения нативной РНК являются инкубация лизируемых клеток и вирусов в присутствии 4 М GTC в течение 5–20 мин при комнатной температуре и сорбция РНК на фильтрах GF/F (GF/C) в 2 М GTC с 50% этанола (изопропанола).

Исходя из этого можно предложить следующую методику выделения РНК с помощью микроцентрифужных фильтров GF/F (GF/C). К 50 мкл пробы (суспензия клеток или вирусов, гомогенаты органов птиц и животных) добавить 400–500 мкл 4 М GTC, перемешать и инкубировать 10–20 мин при комнатной температуре. Для удаления ДНК добавить 100–200 мкл 3% суспензии аэросила А-300 в 4 М GTC и инкубировать еще 2–3 мин с

Сокращения: ВНК-21 – клетки почек сирийского хомячка, ОТ – обратная транскрипция, GTC – гуанидинтиоцианат, ВБН – вирус болезни Ньюкасла.

<sup>#</sup>Автор для переписки (факс: (09222) 3-72-61, 4-36-75).

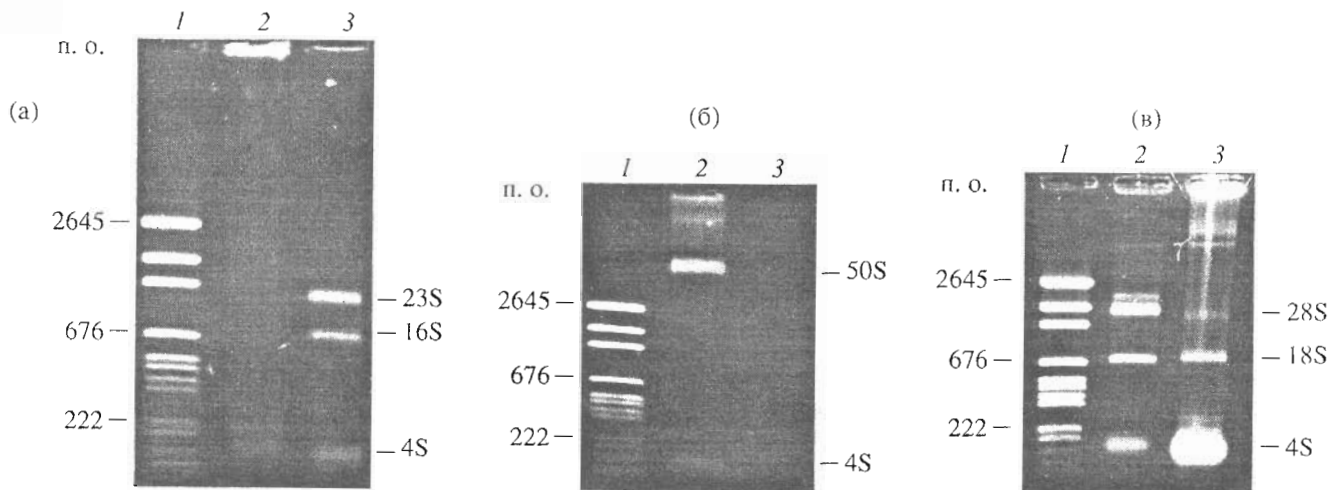


Рис. 1. Электрофорез в 1% агарозе препаратов суммарной РНК, полученных из клеток *E. coli* (а), ВБН (б) и эмбрионов кур (в) с помощью набора RNAagents (дорожки 2) и фильтров GF/F (GF/C) (дорожки 3); дорожки 1 – маркер (pGEM DNA Markers, Promega).

периодическим перемешиванием. Осадить аэросил центрифугированием в течение 2–3 мин, к надосадочной жидкости добавить равный объем этанола (изопропанола), перемешать. Нанести смесь на микроцентрифужный фильтр GF/F (GF/C), удалить раствор центрифугированием (5–10 с) или вакуумированием. Фильтры с сорбированной РНК промыть 2 раза по 200–300 мкл раствором, содержащим 2 М GTC и 50% этанола (изопропанола), и 2–3 раза по 200–300 мкл 80% этанолом (изопропанолом). Фильтры сушить центрифугированием в течение 1–2 мин, РНК элюировать 40–50 мкл воды.

Электрофоретический анализ препаратов суммарной РНК, полученных с помощью набора RNAagents (Promega, США) или фильтров GF/F (GF/C) из клеток *E. coli*, очищенных препаратов ВБН и эмбрионов кур (рис. 1а–1в соответствен-

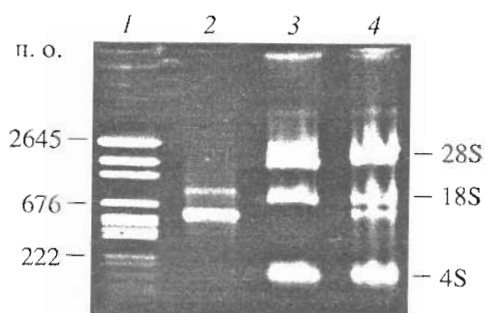


Рис. 2. Электрофорез в 1% агарозе препаратов суммарной РНК, полученных из эмбрионов кур без добавления мРНК (3) и с добавлением перед выделением очищенной мРНК гена устойчивости к канамицину (Promega) (4); 1 – маркер (pGEM DNA Markers, Promega), 2 – мРНК гена устойчивости к канамицину (Promega) (1200 нуклеотидов).

но), показывает, что РНК клеток *E. coli* и ВБН лучше выделяется с помощью стекловолкнистых фильтров. Оба метода дают хорошие результаты для выделения РНК из эмбрионов кур, при этом количество низкомолекулярной РНК значительно меньше в препаратах, выделенных на фильтрах.

Полученная РНК может использоваться без дополнительной очистки для обратной транскрипции, ОТ-ПЦР и непрерывной ОТ-ПЦР по описанным ранее методикам [11, 12] (данные не представлены). Предложенный метод эффективно использовали для выделения РНК вируса ящура, вируса инфекционного бронхита кур и других вирусов из очищенных препаратов и органов кур и животных (данные не представлены). Вероятно, его можно использовать также для получения суммарной РНК с целью выделения из нее пула мРНК, поскольку мРНК, добавленная к гомогенату эмбрионов кур перед выделением суммарной РНК, сорбируется на фильтрах и затем элюируется в общем пуле (рис. 2).

Необходимо отметить, что, меняя концентрацию GTC и спирта на этапах сорбции и промывки фильтров, можно влиять на количество низкомолекулярной фракции в препарате суммарной РНК (рис. 3).

Таким образом, использование стекловолкнистых фильтров в сочетании с различными условиями сорбции и промывок позволяет не только получать очищенные препараты РНК, пригодные для молекулярно-биологических исследований, но и менять их фракционный состав. Поскольку стекловолкнистые фильтры используются и для выделения ДНК, можно говорить о создании универсальной, простой и легко

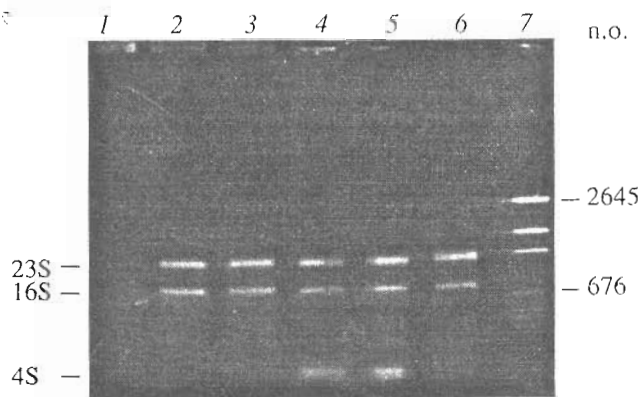


Рис. 3. Электрофорез в 1% агарозе препаратов РНК клеток *E. coli*, полученных на фильтрах GF/F (GF/C) при различных условиях сорбции и промывок: 1–4 – сорбция из растворов, содержащих 12,5, 25, 37,5 и 50% этанола и 3,26, 3, 2,5 и 2 М ГТС соответственно; 5 – промывка фильтра после сорбции РНК (2 М ГТС и 50% этанол) 80% этанолом; 6 – промывка после сорбции 1 раз 1 М ГТС и затем 80% изопропанолом; 7 – маркер (pGEM DNA Markers, Promega).

поддающейся автоматизации системы выделения нуклеиновых кислот.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chen C.W., Thomas C.A. // *Anal. Biochem.* 1980. V. 101. P. 339–341.
2. Jang R.C., Lis J., Wu B. // *Methods Enzymol.* 1979. V. 65. P. 176–182.
3. Kristensen T., Voss H., Ansoorge W. // *Nucleic Acids Res.* 1987. V. 15. P. 5507–5516.
4. Marko M.A., Chipperfield R., Birnboim H.C. // *Anal. Biochem.* 1982. V. 121. P. 382–387.
5. Vogelstein B., Gillespie D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1979. V. 76. P. 615–619.
6. Willis E.H., Mardis E.R., Jones W.L., Little M.C. // *Bio-Techniques.* 1990. V. 19. P. 92–99.
7. Грибанов О.Г., Шербаков А.В., Перевозчикова Н.А., Гусев А.А. // *Биохимия.* 1996. Т. 61. С. 1064–1070.
8. Boom R., Sol C.J.A., Salimans M.M.M., Jansen C.L., Werthim-van Dillen P.M.E., van der Noordaa J. // *J. Clin. Microbiol.* 1990. V. 28. P. 495–503.
9. Boom R., Sol C.J.A., Dillen P.W. // *Nucleic Acids Res.* 1990. V. 18. P. 2195.
10. Chomczynski P., Sacchi N. // *Anal. Biochem.* 1987. V. 162. P. 156.
11. Promega Protocols and Applications Guide. 1991. P. 208.
12. Mallet F., Oriol G., Mary C., Verrier B., Mandrand B. // *BioTechniques.* 1995. V. 18. P. 678–687.

## A Simple Method for RNA Isolation and Purification

O. G. Griбанov, A. V. Shcherbakov, N. A. Perevozchikova, V. V. Drygin, and A. A. Gusev

All-Russian Research Institute of Animal Protection, Vladimir-Yur'evets, 600900 Russia

**Abstract**—RNAs from *Escherichia coli* cells, Syrian hamster kidney cells, foot-and-mouth disease virus, and Newcastle disease virus were isolated using glass fiber filters GF/F or GF/C. The RNA was reversibly adsorbed on the filters in the presence of 2 M guanidine thiocyanate and 50% ethanol (or isopropanol) and eluted with water. The fraction composition of the isolated RNA depended on the guanidine thiocyanate and alcohol concentrations in the adsorption and washing procedures. The RNA preparations obtained by this method can be used in reverse transcription and reverse transcription-polymerase chain reaction without additional purification.

*Key words:* RNA isolation, glass fiber filters.