

## КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 577.21.083

Коробкина Е.А.<sup>1,5</sup>, Князева М.С.<sup>1,5</sup>, Киль Ю.В.<sup>3</sup>, Титов С.Е.<sup>4,6</sup>, Малек А.В.<sup>1,2</sup>

### СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТОДОВ ДЕТЕКЦИИ МИКРОРНК С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ И КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ (ОТ-ПЦР)

<sup>1</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, 197758, Санкт-Петербург;

<sup>2</sup>ООО «Онкосистема», 143026, Москва;

<sup>3</sup>Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт», 188300, Гатчина;

<sup>4</sup>ФГБУН «Институт молекулярной и клеточной биологии» СО РАН, 630090, Новосибирск;

<sup>5</sup>Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, 195251, Санкт-Петербург;

<sup>6</sup>АО «Вектор-Бест», 630559, Кольцово, Россия

Многие патологические состояния сопровождаются характерными изменениями профиля в клетках микроРНК – малых молекул, которые регулируют экспрессию генов на посттранскрипционном уровне. Это даёт возможность рассматривать микроРНК как перспективный класс биологических маркеров. Осуществлено прямое сравнение трёх методов проведения ОТ-ПЦР (*s-Loop*, *u-Elong* и *2-Tail*) для анализа микроРНК с применением синтетического аналога микроРНК-451 для определения эффективности детекции молекул микроРНК и проведён анализ профиля микроРНК-29b, микроРНК-375 и микроРНК-451 в стабильных клеточных линиях OAW42 и HT29. Методами *2-Tail* и *s-Loop* также был проведён анализ семи разных микроРНК в 13 клинических образцах. Результаты показывают, что в подходах *2-Tail* и *s-Loop* проведение ОТ-ПЦР демонстрирует высокую воспроизводимость результатов анализа микроРНК и линейную зависимость эффективности детекции синтетической микроРНК-451 в диапазоне  $10^7$ – $10^3$  молекул на реакцию. По ряду значимых критериев две технологии оказались относительно равноценными, т.е. обе могут быть использованы в качестве основы для метода клинической диагностики.

Ключевые слова: микроРНК (миРНК); ОТ-ПЦР; биомаркеры; молекулярная диагностика.

**Для цитирования:** Коробкина Е.А., Князева М.С., Киль Ю.В., Титов С.Е., Малек А.В. Сравнительный анализ методов детекции микроРНК с помощью метода обратной транскрипции и количественной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР). Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (11): 722-728. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-11-722-728>

Korobkina E.A.<sup>1,5</sup>, Knyazeva M.S.<sup>1,5</sup>, Kil Yu.V.<sup>3</sup>, Titov S.E.<sup>4,6</sup>, Malek A.V.<sup>1,2</sup>

#### COMPARATIVE ANALYSIS OF RT-QPCR BASED METHODOLOGIES FOR MICRORNA DETECTION

<sup>1</sup>N.N. Petrov Research Institute of Oncology, 197758, Saint Petersburg, Russia;

<sup>2</sup>“Oncosystem” Ltd., 143026, Skolkovo, Russia;

<sup>3</sup>Petersburg Nuclear Physics Institute of National Research Center “Kurchatov Institute”, 188300, Gatchina, Russia;

<sup>4</sup>Institute of Molecular and Cellular Biology, Siberian Branch of The Russian Academy of Sciences, 630090, Novosibirsk, Russia;

<sup>5</sup>Peter the Great Saint-Petersburg Polytechnic University, 195251 Saint Petersburg, Russia;

<sup>6</sup>AO Vector-Best, 630117, Novosibirsk, Russia

Many pathological states are accompanied by characteristic changes in the cellular profile of microRNAs – small molecules that regulate gene expression at the posttranscriptional level. This allows us to consider miRNA as a promising class of biological markers. In the work, a direct comparison of three RT-qPCR methodologies (*s-Loop*, *u-Elong* and *2-Tail*) for miRNA analysis was performed. A synthetic miRNA-451 analog was used to determine the efficiency of miRNA molecule detection and analysis of the miRNA-29b, miRNA-375 and miRNA-451 profiles in OAW42 and HT29 cell lines was carried out. By the methods of *2-Tail* and *s-Loop*, seven different miRNA were also analyzed in 13 clinical specimens. The results of the study show that in the *2-Tail* and *s-Loop* approaches, RT-qPCR demonstrated high reproducibility in results of miRNA analysis, and a linear dependence of the mimic miRNA-451 detection efficiency in the range of  $10^7$  to  $10^3$  molecules per reaction was registered. On a number of significant criteria, the two technologies turned out to be relatively equivalent, i.e. any of them can be used as a basis for the method of clinical diagnostics.

Key words: microRNA (miRNA); RT-qPCR; biomarkers; molecular diagnostics.

**For correspondence:** Malek A.V., PhD, Head of Oncoendocrinology Lab, N.N. Petrov Research Institute of Oncology, 197758 Saint Petersburg, Russia; e-mail: [anastasia@malek.com](mailto:anastasia@malek.com)

**For citation:** Korobkina E.A., Knyazeva M.S., Kil Yu.V., Titov S.E., Malek A.V. Comparative analysis of RT-qPCR based methodologies for microRNA detection. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2018; 63 (11): 722-728. (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-11-722-728>

**Information about authors:**

Malek A.V. <https://orcid.org/0000-0001-5334-7292>

Kil Yu.V. <https://orcid.org/0000-0003-4603-5885>

Titov S.E. <https://orcid.org/0000-0001-9401-5737>

**Conflict of interest.** *The author declare the absence of conflict of interests.*

**Acknowledgment.** *This work was conducted in frame of the State Assignment from Russian Ministry of Health "Development of a test system for non-invasive early diagnostics and monitoring the efficiency of prostate cancer treatment" (ID 1129) with financial support of "Oncosystem" Ltd.*

Received 01.08.2018

Accepted 04.10.2018

*Введение.* МикроРНК – класс молекул РНК, строение и биологические функции которых описаны относительно недавно [1]. Это короткие одноцепочечные молекулы, которые регулируют экспрессию генов на посттранскрипционном уровне путём комплементарного взаимодействия с молекулами информационной (матричной) РНК. Таким образом, в клетке регулирован синтез большинства белковых молекул, вовлечённых в разные аспекты клеточной биологии. К настоящему времени у человека описано около трёх тысяч разных микроРНК. Профиль экспрессии микроРНК, отражающий количественный уровень каждой из них, специфичен для клеток разных тканей и характеризуется несколькими десятками (или сотнями) так называемых мажорных молекул. Многие патологические состояния сопровождаются характерными изменениями клеточного профиля микроРНК, что позволяет рассматривать эти молекулы как перспективный класс биологических маркёров. На основе анализа микроРНК активно идёт разработка новых методов диагностики разных заболеваний. Очевидный прогресс достигнут в онкологии [2, 3], где такие диагностические системы находятся на стадиях разработки, испытаний или их уже применяют в клинической практике для выявления онкологических заболеваний, включая рак предстательной железы [4], щитовидной железы [5], колоректальный рак [6].

Для количественного анализа микроРНК принципиально применимы те же методы, которые традиционно используют для анализа микроРНК; это технология микрочипов (microarrays) [7], секвенирование, включая полногеномное секвенирование РНК (RNA-seq) [8] и метод обратной транскрипции (ОТ) с последующей полимеразной цепной реакцией – ПЦР (RT-qPCR) [9]. Существует ряд альтернативных методик количественной оценки микроРНК на основе реакции амплификации; однако пока они не нашли широкого применения [10-12]. В настоящее время метод ОТ-ПЦР является наиболее часто используемым в силу надёжности и относительно низкой стоимости.

Несмотря на широкое распространение, практическое использование метода ОТ-ПЦР, получение воспроизводимых результатов и их клиническая интерпретация не является тривиальной задачей. Результаты анализа микроРНК в большой мере зависят от качества выделяемых из биологических образцов препаратов общей РНК [13]. Кроме того, при работе с микроРНК имеют значение такие аспекты, как наличие незрелых форм [14] и небольшой размер зрелых молекул [9]. Длина зрелой молекулы микроРНК сопоставима по размерам с длиной праймеров, пара которых должна иметь места посадки на протяжении определяемой молекулы для инициации ПЦР. Поэтому перед проведением аналитической ПЦР необходимо удлинить молекулу микроРНК. Этот этап синтеза молекулы ДНК, которая должна иметь длину как минимум 50-60 оснований и часть которой комплементарна определяемой микроРНК, является критичным аспектом метода анализа микроРНК с помощью ОТ-ПЦР.

В 2005 г. предложен метод ОТ микроРНК с помощью праймера, формирующего так называемую петлю (stem-loop primer) [15]. Такой подход позволял в результате реакции ОТ получить

ДНК длиной 50–60 оснований; это обеспечивает возможность использовать такую молекулу в качестве матрицы для последующей ПЦР (рис 1, а). В течение нескольких лет этот метод оптимизирован и его широкое использование позволяет получать достоверные результаты [16]. Важной особенностью этого подхода является молекулярная специфичность проведения реакции ОТ: для каждого типа детектируемых микроРНК синтезирован и использован соответствующий ОТ-праймер. Позднее предложены еще несколько методов синтеза кДНК, основной особенностью которых являлось неспецифическое удлинение всех присутствующих в образце молекул микроРНК. Последующую реакцию ОТ инициирует праймер, комплементарный добавленному участку. Такая реакция неспецифична и теоретически позволяет получить пул разных кДНК, соответствующих набору микроРНК в исследуемом образце. Этот подход, с одной стороны, позволяет экономно использовать биологический материал для анализа большого числа молекул микроРНК. С другой стороны, чувствительность этого метода ниже, так как реакция ОТ инициирована с помощью универсального праймера равновероятно для всех молекул микроРНК; это, однако, может затруднять определение молекул с низкой мерой копирования. Методы удлинения микроРНК, которые предшествуют ОТ, могут быть разными: синтез поли-А [17] или поли-У [18] цепочки на 3'-конце микроРНК или ферментативное присоединение (лигирование) ДНК молекулы – адаптера [19] (рис. 1, б).

Оригинальный метод удлинения и ОТ предложен группой чешских исследователей [20]. Этот метод предполагает использование для ОТ относительно длинного праймера, который формирует петлю в середине молекулы, а два его конца комплементарно связывают концы детектируемой микроРНК, располагаясь навстречу друг другу (рис. 1, с). Реакция ОТ инициирует один из концов (3'-) праймера, при этом в процессе транскрипции происходит диссоциация второго конца (5'-) и синтез фрагмента кДНК, комплементарного полноразмерной молекуле микроРНК. Таким образом, образуется молекула кДНК достаточной длины и оба конца её имеют участки, комплементарные детектируемой микроРНК; это позволяет использовать два микроРНК-специфичных праймера для ПЦР. Влияние специфической структуры олигонуклеотида – праймера ОТ на эффективность (специфичность и чувствительность) предложенного метода детектирования микроРНК детально обсуждено авторами в ранее опубликованной работе [20].

Цель исследования – определение наиболее приемлемого метода для использования в клинической практике. Для этого проведено прямое сравнение нескольких ОТ-ПЦР технологий анализа микроРНК, схематически представленных на рис. 1 и обозначенных в тексте как s-Loop, u-Elong и 2-Tail.

*Материал и методы.* Стабильные линии клеток колоректального рака HT-29 [21] и рака яичников OAW-42 [22] культивировались в стандартных условиях (среда RPMI-1640 с L-глутамином и 10% эмбриональной сыворотки телят (БиоЛот, СПб) при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Образцы цитологических препаратов, которые содержат материал тонкоигольной, аспирационной биопсии узлов щитовидной железы, получены в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова». Протокол исследования утверждён

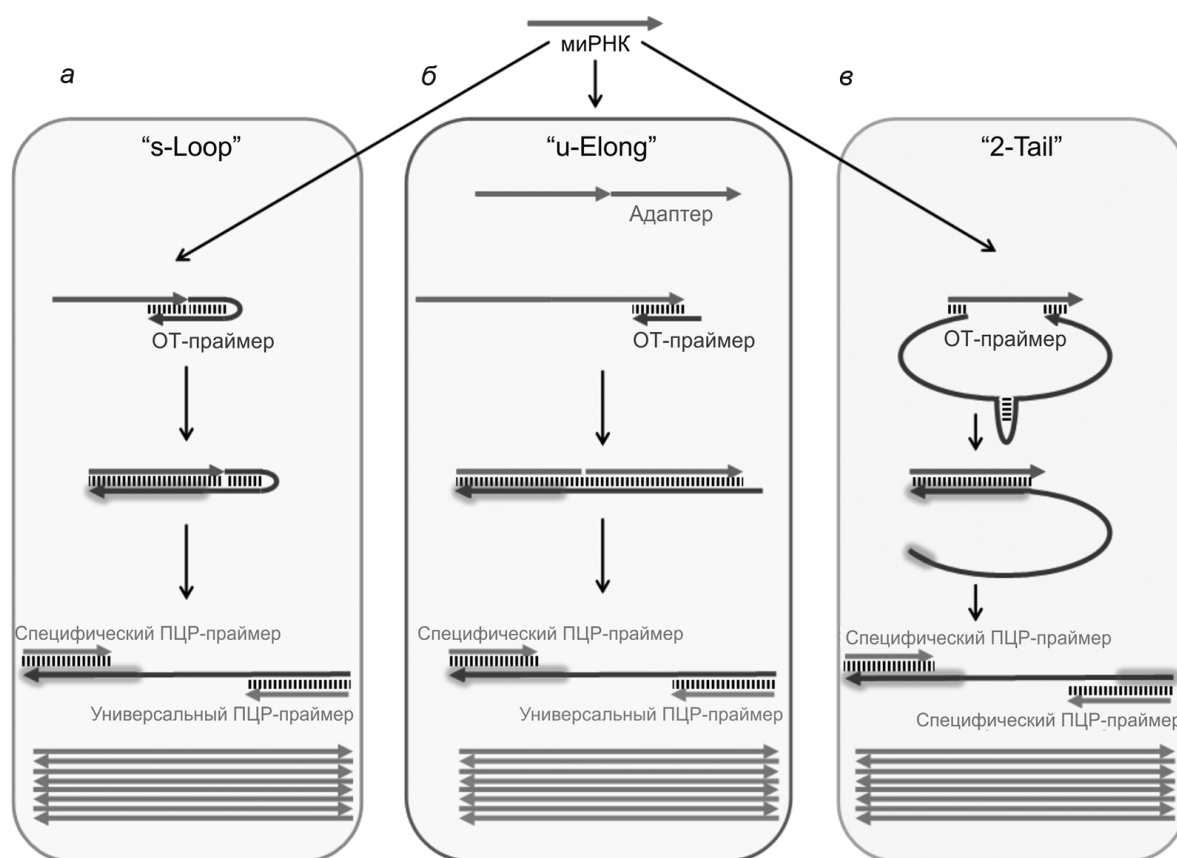


Рис. 1. Схема детекции молекул микроРНК тремя разными подходами проведения ОТ-ПЦР: методы s-Loop, u-Elong и 2-Tail (пояснения в тексте).

дён Комитетом по этике при «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» (№1/66 из протокола заседания №7 от 17.05.2018). Для выделения РНК из препаратов использовали наборы для выделения на основе спин-колонок производства компании «Био-Силика» (Новосибирск, Россия). РНК из биопсийного материала выделяли по ранее описанному протоколу [23].

Дизайн олигонуклеотидов для анализа трёх молекул микроРНК представлен в табл. 1. В системе stem-loop с целью оптимизации температуры отжига праймеров в ходе ПЦР отдельные нуклеотиды в их составе модифицированы (Locked Nucleic Acid, LNA). Дизайн олигонуклеотидов для методов u-Linker и 2-Tail выполнен согласно рекомендациям авторов [19, 20]. Олигонуклеотиды, использованные в реакциях ОТ-ПЦР-анализа трёх миРНК (миРНК-29b, миРНК-375 и миРНК-451), были синтезированы АО «Вектор Бест» (Новосибирск, Россия), ООО «Праймтех» (Минск, Республика Беларусь) и компанией «IDT» (Skokie, США). Синтетическая олигоРНК, имитирующая микроРНК-451, синтезирована компанией ООО «БИОСАН» (Новосибирск, Россия). Информация по остальным олигонуклеотидам может быть предоставлена по запросу. Анализ миРНК методом ОТ-ПЦР проводили с использованием амплификатора Real-Time CFX96 производства компании Bio-Rad Laboratories (Hercules, США) на 96-луночном планшете согласно трём протоколам:

1. *s-Loop*. Реакционная смесь для ОТ содержала: 2 мкл раствора выделенной РНК, 16,2 мкл 40% раствора трегалозы, 3 мкл 10× буфера для ОТ (АО «Вектор-Бест»), 3 мкл 4 мМ раствора дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, 3 мкл 10% раствора BSA, 100 е.а. M-MLV обратной транскриптазы (АО «Вектор-Бест»), 1,5 мкл 10 мкМ раствора соответствующего праймера

для ОТ. Реакцию проводили в течение 30 мин при 42°C, после чего обратную транскриптазу инактивировали 2 мин при 95°C. 2 мкл смеси использовали для ПЦР. Объём реакционной смеси для каждой реакции ПЦР составлял 30 мкл: 2 мкл полученной кДНК, 15 мкл H<sub>2</sub>O, 3 мкл 10× буфера для ПЦР (АО «Вектор-Бест»), 3 мкл 4 мМ раствора дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (ООО «Биосан»), 3 мкл 10% раствора BSA, 1 е.а. Taq-полимеразы (АО «Вектор-Бест») в комплексе с моноклональными антителами к её активному центру (Clontech, США), 3 мкл раствора прямого и обратного праймеров (5 мкМ) и зонда (2,5 мкМ). Протокол ПЦР: предварительный прогрев при 94°C – 2 мин, 50 основных циклов: денатурация при 94°C – 10 с, отжиг и элонгация: 60°C – 20 с.

2. *u-Elong*. Стадии лигирования линкера и реакцию ОТ проводили в полном соответствии с предложенной методикой [19], включая использование рекомендованных ферментов: T4 RNA Ligase 2, truncated K227Q (New England Biolabs) в лигазной реакции и PrimeScript™ 1st strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa/Clontech) для проведения ОТ. ПЦР в реальном времени с использованием стандартного набора БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue (2×) (БиоМастер, Новосибирск) проводили по следующему протоколу: за прогревом реакции при 95°C в течение 6 мин следовали 45 циклов, состоящих из повторов по 10 с при 95°C и 35 с при 64°C. Стандартная реакция (20 мкл) содержала 2 пмоль микроРНК-специфического и универсального Urm2A праймеров каждого и 2 мкл раствора кДНК, полученной на первой стадии.

3. *2-Tail*. Все стадии ОТ-ПЦР в рамках этого метода выполняли в соответствии с оригинальным протоколом [20] за исключением того, что объёмы всех реакций были увеличены до 20



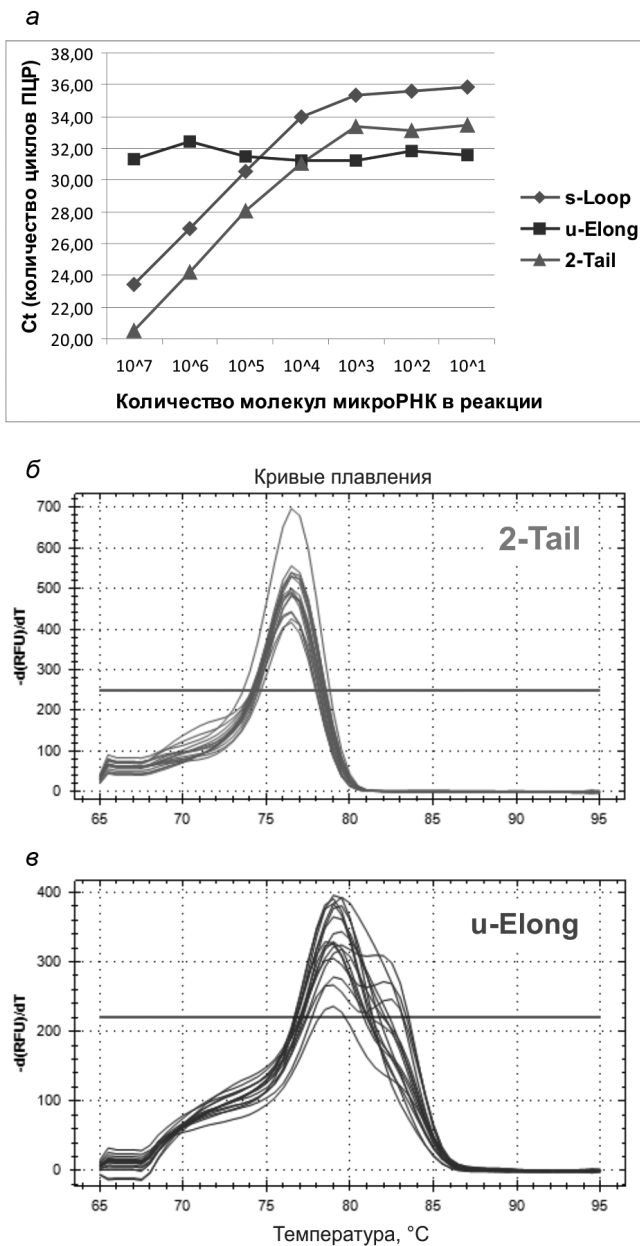


Рис. 2. Результаты детектирования синтетической микроРНК (микроРНК-451) тремя подходами проведения ОТ-ПЦР.

а – динамический диапазон регистрируемых концентраций микроРНК; кривые плавления конечного продукта ПЦР, получаемого методами 2-Tail (б) и u-Long (в).

мкл и в анализе использовали стандартные наборы российского производства от компании БиоМастер: ОТ-M-MuLV-RN для проведения реакции ОТ и HS-qPCR SYBR Blue (2×) для проведения ПЦР. Во всех анализах в ПЦР использовали десятую часть (2 мкл) кДНК, полученной в результате реакции ОТ.

**Результаты.** Мы провели сравнение эффективности трёх разных подходов ОТ-ПЦР для количественной оценки семи вариантов микроРНК. Для определения динамического диапазона регистрируемых концентраций микроРНК разными методами ОТ-ПЦР использован аналог микроРНК-451 с известной концентрацией. Для анализа микроРНК в биологическом материале использованы образцы тотальной РНК, выделенной из

клеток двух линий и 13 клинических образцов (тонкоигольной аспирационной биопсии узлов щитовидной железы). При проведении ОТ-ПЦР методами u-Elong и 2-Tail детекцию сигнала проводили с помощью красителя SYBR Green I. В методике s-Loop использовали флуоресцентный зонд с красителем HEX, что обеспечивало повышение специфичности метода.

**Динамический диапазон регистрации синтетической микроРНК-451.** На основе исходного препарата синтетической микроРНК-451 с концентрацией 100 пкМ мы создали серию последовательных десятикратных разведений таким образом, чтобы реакция ОТ-ПЦР стартовала в каждом случае в диапазоне от 10<sup>7</sup> до 10 молекул микроРНК на реакцию. Согласно полученным результатам (рис. 2, а), линейную зависимость между концентрацией детектируемой микроРНК молекулы и данными ОТ-ПЦР наблюдали в случае использования систем s-Loop и 2-Tail в диапазоне концентраций 10<sup>7</sup>–10<sup>3</sup> молекул на реакцию. При снижении концентрации детектируемой молекулы наблюдалась стабилизация значения Ct на 33–33,5 (2-Tail) или 35–36 (s-Loop) циклах. Результаты, полученные методом универсальной элонгации (u-Elong), слабо зависели от концентрации детектируемой молекулы, что не позволяет расценивать этот метод как подходящий для количественного анализа, по крайней мере в случае микроРНК-451.

Кроме того, кривые плавления (melting curve) при проведении ПЦР, которые являются контролем специфичности проводимой реакции, в случае анализа микроРНК-451 методом u-Elong показали наличие побочных продуктов (рис. 2, в) в виде дополнительных пиков. На кривой денатурации продукта ОТ-ПЦР по методике 2-Tail мы выявили лишь один узкий пик с температурой плавления 76,5°C (см. рис. 2, б), что соответствует характеристикам ожидаемого продукта ПЦР (70 нуклеотидных пар с 46% GC-составом).

**Анализ экспрессии разных микроРНК в культивируемых клеточных линиях.** Для сравнения эффективности трёх методик в ряде параллельных экспериментов проведена оценка концентрации трёх молекул (микроРНК-29b, микроРНК-375, микроРНК-451) в препаратах РНК, выделенных из культур клеток рака яичников (OAW42) и колоректального рака (HT29). Выбранные микроРНК (рис. 3) имеют лишь по одной биологически активной изоформе, но отличаются особенностями биогенеза (для микроРНК-29b и микроРНК-375 биологически активной является форма 3p, а для микроРНК-451 – 5p), а также гуанин-цитозинным составом (микроРНК-29b и микроРНК-451 – 35-36% GC; микроРНК-375 – 55% GC). Перечисленные особенности могут оказывать влияние на эффективность детекции методом ОТ-ПЦР.

Все реакции ОТ-ПЦР для трёх микроРНК (микроРНК-29b, микроРНК-375, микроРНК-451) тремя системами детектирования (s-Loop; u-Elong; 2-Tail) с использованием двух препаратов тотальной РНК (OAW42, HT29) проведены с тройными повторами. Результаты, представленные на рис. 4 в виде значений Ct, отражают хорошую воспроизводимость всех трёх методов: стандартные отклонения по трём измерениям не превышали 2,5% от среднего значения. При этом можно заметить, что эффективность детектирования микроРНК-375 с высоким содержанием GC изменяется в ряду тестируемых методов как s-Loop >> u-Elong >> 2-Tail. Для молекул с низким содержанием GC, микроРНК-29b и микроРНК-451, отметили обратную тенденцию.

В ходе каждого эксперимента, кроме анализа пиков кривой плавления конечных продуктов ПЦР, проводили реакцию ПЦР с реакционной смесью, не содержащей кДНК (безматричный контроль; англ. NTC – No Template Control), с целью оценки вероятности формирования в реакции ПЦР так называемых «праймерных димеров» в результате их взаимодействия друг с другом. Такой контроль часто давал позитивный результат при использовании системы u-Elong, причём кривая флуоресценции в безматричной реакции пересекала пороговую линию (C<sub>t</sub>) лишь на 1–3 цикла позднее, чем в ре-



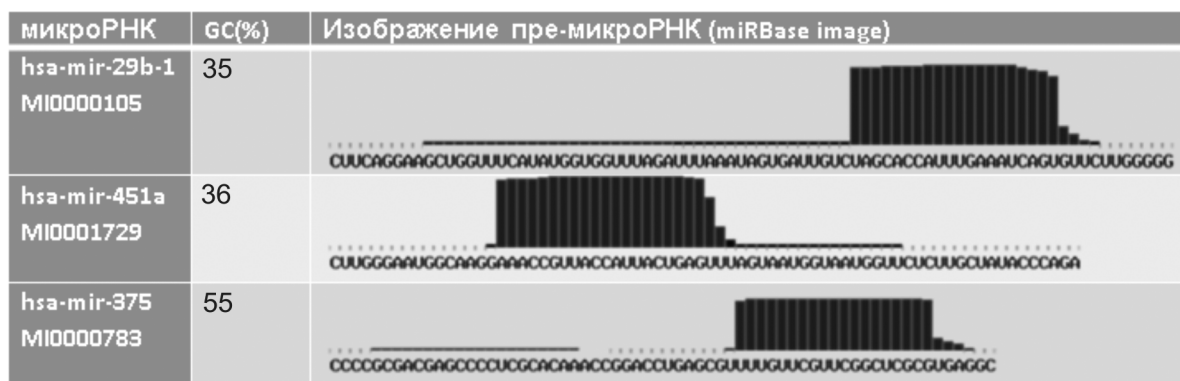


Рис. 3. Структура незрелых микроРНК по данным сайта [www.mirbase.org](http://www.mirbase.org). Представлены последовательности микроРНК-29b, микроРНК-451a и микроРНК-375 с указанием процентного содержания GC-пар в их составе. Вертикальными барами отмечены биологически активные последовательности зрелых микроРНК: 5p в случае микроРНК-451a и 3p в случае микроРНК-29b и микроРНК-375.

акции, содержащей кДНК. Это говорит о том, что структура праймеров в системе u-Elong допускает их комплементарное взаимодействие, которое может инициировать неспецифическую ПЦР и приводить к ложноположительным результатам. Образование праймерных димеров или иных неспецифических продуктов в процессе проведения ПЦР подтверждается анализом кривой плавления, полученной в эксперименте с синтетическим аналогом микроРНК-451 (см. рис. 2, в).

В линии клеток колоректального рака HT29 удалось определить микроРНК-29b методом s-Loop ( $C_t = 32,9$ ), две другие методики оказались неэффективны. При этом результаты анализа двух других молекул были сопоставимы. Бо-

лее того, микроРНК-451, которую мы определяли методом s-Loop на более поздних циклах (т.е. менее эффективно), чем микроРНК-29b, можно было определить методами u-Elong и 2-Tail. Согласно полученным результатам, эффективность определения зависит не только от метода, но и от особенностей детектируемой молекулы микроРНК и структуры используемых праймеров.

*Анализ экспрессии разных микроРНК в клинических образцах.* С учётом результатов, полученных методом элонгации микроРНК и последующей неспецифической ОТ (отсутствие зависимости эффективности ПЦР от концентрации детектируемой микроРНК и высокий уровень сигнала в безматричной контрольной пробе), мы отказались от использования метода u-Elong как минимум в предложенном варианте исполнения.

Детальное сопоставление эффективности методов s-Loop и 2-Tail было проведено с использованием 13 образцов РНК, выделенной из материала тонкоигольной биопсии узлов щитовидной железы. Анализ концентрации семи микроРНК проведён параллельно двумя методами; каждая реакция проведена в трёх повторах. В качестве примера репрезентативные результаты анализа трёх биологических образцов представлены на рис. 5. Как и в предшествующих экспериментах, низкие значения стандартных отклонений выявили хорошую воспроизводимость результатов. При этом эффективность детекции разных молекул методами s-Loop и 2-Tail существенно различалась. Анализ результатов, полученных для отдельных микроРНК, показывает, что соотношение значений  $C_t$  повторяется в ряду разных биологических образцов. Для верификации этого наблюдения соотношение значений  $C_t(s\text{-Loop}) / C_t(2\text{-Tail})$  мы подсчитали для каждой тестируемой микроРНК. Эти соотношения для разных молекул микроРНК разные, но для каждой молекулы они сохранялись в ряду биологических образцов. В табл. 2 представлены усреднённые (для 13 образцов РНК) значения  $C_t(s\text{-Loop}) / C_t(2\text{-Tail})$  и соответствующие значения стандартных отклонений. Низкие значения стандартных отклонений подтверждают наше предположение о том, что получаемые разными методами ОТ-ПЦР результаты анализа концентрации (экспрессии) микроРНК зависят от метода и от структуры детектируемой молекулы, т.е. результаты, полученные одним методом, могут быть не воспроизведены другим. Но при этом соотношение данных, полученных методами s-Loop и 2-Tail, сохраняется постоянным при анализе разных биологических образцов.

*Обсуждение.* В обозримом будущем методы анализа микроРНК в биопсийном материале войдут в клиническую практику. Наборы для предоперационной диагностики узловых образований щитовидной железы, предлагаемые рядом

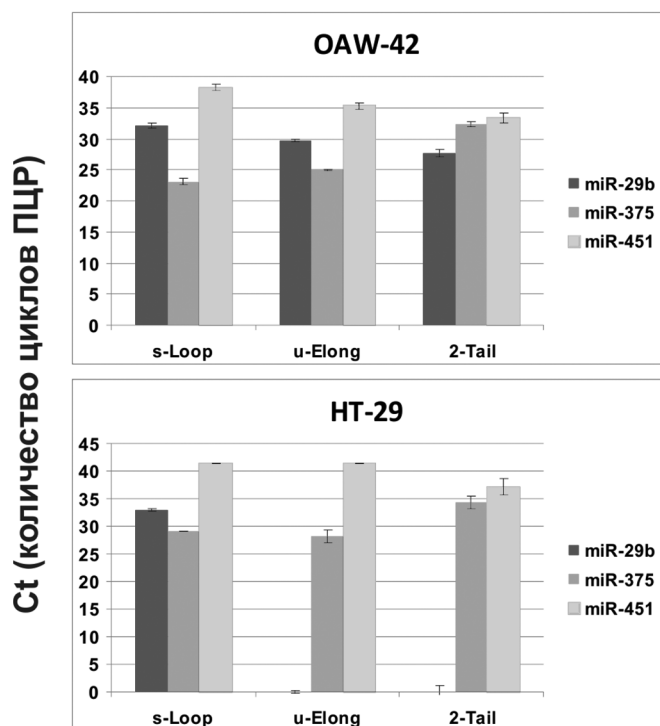


Рис. 4. Результаты анализа микроРНК-29b, микроРНК-375 и микроРНК-451a в образцах РНК, выделенных из клеточных культур. OAW42 – линия клеток рака яичников; HT29 – линия клеток колоректального рака.

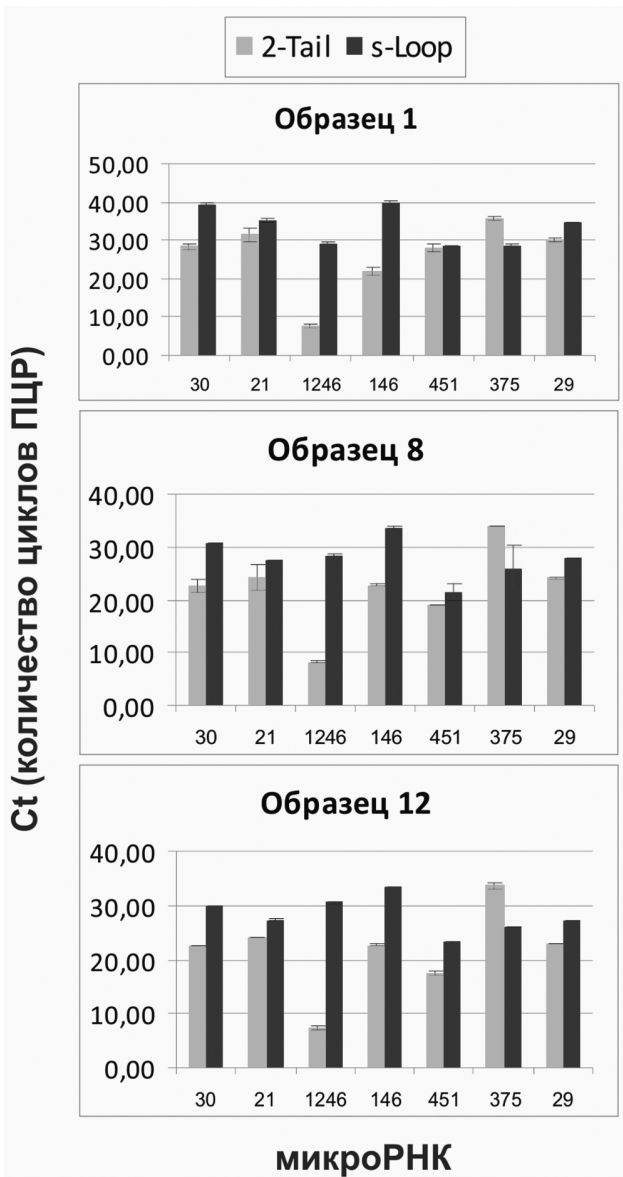


Рис. 5. Примеры детектирования семи разных микроРНК методами 2-Tail и s-Loop для трёх клинических образцов: 1, 8 и 12.

зарубежных компаний, уже используют в клинике в качестве дополнения к стандартным диагностическим алгоритмам («Rosetta GXReveal» / Rosetta Genomics; «ThyraМИРНК» / Interpace diagnostics). Методы прогнозирования течения или ответа на гормональную терапию рака предстательной железы проходят клинические испытания (NCT02964351, NCT01220427, NCT02366494). Успех внедрения этих методов в клиническую практику зависит от двух факторов: диагностической значимости изменений экспрессии микроРНК, выявленных в ходе научных исследований, во-первых, и доступности лабораторных технологий анализа микроРНК, во-вторых. Результаты нашего исследования подтверждают возможность использовать метод ОТ-ПЦР для анализа микроРНК в клинических образцах. Описанные методы имеют стоимость, сопоставимую со стоимостью рутинных ПЦР-тестов, которые используют для определения инфекций или генетических мутаций, и теоретически могут быть воспроизведены в клинично-диагностической лаборатории.

В рамках исследования нам не удалось показать диагностическую значимость технологии u-Elong, которая включает этап лигирования всех молекул микроРНК и не микроРНК - специфическую реакцию обратной транскрипции. Наши результаты расходятся с данными, представленными авторами методики [19], что не ставит под сомнение их достоверность, но указывает на нетривиальность задачи воспроизведения или внедрения в практику этой технологии. Следует учитывать, что данная методика является оптимальной для проведения «профайлинговых» исследований с целью поиска диагностически значимых молекул микроРНК в рамках научных проектов, но не в клинической диагностике. Таким образом, воспроизведение методики u-Elong является скорее задачей для научных лабораторий. Кроме того, наборы для «профайлингового» анализа микроРНК на основе аналогичных технологий разработаны рядом биотехнологических компаний («for research only») – микроРНКCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR panels / Qiagen или TaqMan™ Advanced

Таблица 1

Последовательности олигонуклеотидов		
миРНК-29b-1	Loop primer RT	gtcgtgtctgaggctcactgagaccttgcac cctcgacacgaca(c)ac(t)gat
	s-Loop PCR-forward	cagcactagcaccatttgaa
	PCR-reverse	ctgaggctcactgagacct
	Probe	ttcgaccctcgacagacaactgat
	Adaptor	ggccgaactacgacctgcataaacgg
u-Elong	mQ-RT	cccagttatggccgttatgacaggt
	PCR-forward-sp	tagcaccattgaaatcagttg
	PCR-reverse Upm2A	cccagttatggccgttta
2-Tail	RT	tggtgctagctgagctcctgtagagttgc- tacgagatataataaacact
	PCR-forward	tggtgctagctgagctc
	PCR-reverse	tagcgcattgaaatcagtg
миРНК-375	Loop primer RT	gtcgtgtcagaggctcactgagacctattgc acctcgacagact(c)acg(c)ga
	s-Loop PCR-forward	acagcttgttcgttcggc
	PCR-reverse	ctgaggctcactgagacct
	Probe	cgacacgactcagcga
	Adaptor	ggccgaactacgacctgcataaacgg
u-Elong	mQ-RT	cccagttatggccgttatgacaggt
	PCR-forward-sp	ttgttcgttcggtcgc
	PCR-reverse Upm2A	cccagttatggccgttta
2-Tail	RT	cgaacaactcaagctcctcaggctacagttg- gtacctgactccagctcacgc
	PCR-forward	cgaacaactcaagctcctcag
	PCR-reverse	cgggttgttcgttcggctc
миРНК-451	Loop primer RT	gtcgtgtcagaggctcactgagacctattgca cctcgacacgaca(c)(t)(c)agt
	s-Loop PCR-forward	ccagcaaacggtaccatt
	PCR-reverse	ctgaggctcactgagacct
	Probe	cgacacctcgacagacaactcagta
	Adaptor	ggccgaactacgacctgcataaacgg
u-Elong	mQ-RT	cccagttatggccgttatgacaggt
	PCR-forward-sp	aaacctgaccattactgagtt
	PCR-reverse Upm2A	cccagttatggccgttta
2-Tail	RT	aacggttcagacaactactgtagag- tgctagcagagccctaaactca
	PCR-forward	caacggttcgacgaatac
	PCR-reverse	ggaaacggttaccattactg

Примечание. Нуклеотиды в скобках в составе Loop primer RT (s-Loop) имеют структуру LNA (locked nucleic acid)

Таблица 2

Соотношение результатов ОТ-ПЦР, полученных методами 2-Tail и s-Loop

миРНК	Средние значения соотношения результатов 2-Tail / s-Loop	Стандартное отклонение
миРНК-30	0,77	0,04
миРНК-21	0,89	0,04
миРНК-1246	0,25	0,03
миРНК-146b	0,65	0,08
миРНК-451	0,84	0,14
миРНК-375	1,08	0,18
миРНК-29b-1	0,95	0,12

миРНКNA Human Cards / ThermoFischer Scientific. Использование этих наборов может обеспечить получение достоверных результатов в рамках исследовательской работы.

Сравнение двух других методов анализа специфических молекул микроРНК (s-Loop и 2-Tail) показало сопоставимые результаты. Особое внимание привлекает факт высокой воспроизводимости результатов, которые получены каждым из этих методов. В относительно широком диапазоне концентраций миРНК-451 ( $10^7$ - $10^3$  молекул на реакцию) оба метода выявили хорошую линейную зависимость. Сопоставимой оказывается и стоимость исследований, проведенных методами s-Loop и 2-Tail. Так, по ряду значимых критериев две технологии оказались относительно равноценны, т.е. любую из них можно использовать в качестве основы для метода клинической диагностики. Особого внимания требует факт систематического (воспроизводимого) расхождения результатов, полученных двумя технологиями, для ряда молекул микроРНК. Можно предполагать, что особенности конкретной микроРНК (нуклеотидная последовательность, GC-состав, вторичная структура) определяют эффективность определения этой микроРНК тем или иным методом. Понимание наблюдаемого феномена требует дополнительных исследований. Результаты представленной работы позволяют лишь сделать вывод о том, что использование разных технологий потребует особой осторожности в ходе клинического применения результатов.

**Заключение** Методы 2-Tail и s-Loop, примененные нами как для анализа эффективности определения разных концентраций синтетической микроРНК-451, так и для определения профилей семи микроРНК для культивируемых линий и клинических образцов щитовидной железы, в целом показали высокий уровень соответствия результатов, что говорит о возможности их применения в клинической диагностике.

**Финансирование.** Исследование проведено в рамках темы государственного задания Минздрава России «Разработка тест-системы для малоинвазивной ранней диагностики и мониторинга эффективности лечения рака предстательной железы» (ID 1129) при финансовой поддержке ООО «Онко-система».

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-22 см. REFERENCES)

23. Колесников Н.Н., Титов С.Е., Верякина Ю.А., Владимирова А.В., Самсонов Р.Б., Артемьева А.С. и др. Повышение точности и информативности тонкоигольной аспирационной пункционной биопсии опухолей молочной железы путем анализа микроРНК в материале цитологического мазка. *Успехи молекулярной онкологии*. 2016; 3 (1): 44-52.

REFERENCES

- Fabbri M., Croce C.M., Calin G.A. MicroRNAs. *Cancer journal*. 2008; 14 (1): 1-6.
- Sethi S., Sethi S., Bluth M.H. Clinical Implication of MicroRNAs in Molecular Pathology: An Update for 2018. *Clinics in laboratory medicine*. 2018; 38 (2): 237-51.
- Peng Y., Croce C.M. The role of microRNAs in human cancer. *Signal transduction and targeted therapy*. 2016; 1: 15004.
- Sharma N., Baruah M.M. The microRNA signatures: aberrantly expressed miRNAs in prostate cancer. *Clinical and translational oncology*. 2018.
- Nikiforov Y.E. Role of Molecular Markers in Thyroid Nodule Management: Then and Now. *Endocrine practice : official journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists*. 2017; 23 (8): 979-88.
- Feng H., Xu M., Zhang Y., Han B., Wang J., Sun P. Identification of Differentially Expressed MicroRNAs involved in the Pathogenesis of Colorectal Cancer. *Clinical laboratory*. 2018; 64 (5): 797-804.
- Ranade A.R., Weiss G.J. Methods for microRNA microarray profiling. *Methods in molecular biology*. 2011; 700: 145-52.
- Liu J., Jennings S.F., Tong W., Hong H. Next generation sequencing for profiling expression of miRNAs: technical progress and applications in drug development. *Journal of biomedical science and engineering*. 2011; 4 (10): 666-76.
- Benes V., Castoldi M. Expression profiling of microRNA using real-time quantitative PCR, how to use it and what is available. *Methods*. 2010; 50 (4): 244-9.
- Deng R., Zhang K., Li J. Isothermal Amplification for MicroRNA Detection: From the Test Tube to the Cell. *Accounts of chemical research*. 2017; 50 (4): 1059-68.
- Jin J., Vaud S., Zhelkovsky A.M., Posfai J., McReynolds L.A. Sensitive and specific miRNA detection method using SplintR Ligase. *Nucleic acids research*. 2016; 44 (13): e116.
- Ma F., Liu M., Tang B., Zhang C.Y. Sensitive Quantification of MicroRNAs by Isothermal Helicase-Dependent Amplification. *Analytical chemistry*. 2017; 89 (11): 6182-7.
- Ibberson D., Benes V., Muckenthaler M.U., Castoldi M. RNA degradation compromises the reliability of microRNA expression profiling. *BMC biotechnology*. 2009; 9: 102.
- Tong L., Xue H., Xiong L., Xiao J., Zhou Y. Improved RT-PCR Assay to Quantitate the Pri-, Pre-, and Mature microRNAs with Higher Efficiency and Accuracy. *Molecular biotechnology*. 2015; 57 (10): 939-46.
- Chen C., Ridzon D.A., Broomer A.J., Zhou Z., Lee D.H., Nguyen J.T. et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic acids research*. 2005; 33 (20): e179.
- Varkonyi-Gasic E., Hellens R.P. Quantitative stem-loop RT-PCR for detection of microRNAs. *Methods in molecular biology*. 2011; 744: 145-57.
- Balcells I., Cirera S., Busk P.K. Specific and sensitive quantitative RT-PCR of miRNAs with DNA primers. *BMC biotechnology*. 2011; 11: 70.
- Mei Q., Li X., Meng Y., Wu Z., Guo M., Zhao Y. et al. A facile and specific assay for quantifying microRNA by an optimized RT-qPCR approach. *PLoS one*. 2012; 7 (10): e46890.
- Benes V., Collier P., Kordes C., Stolte J., Rausch T., Muckenthaler M.U. et al. Identification of cytokine-induced modulation of microRNA expression and secretion as measured by a novel microRNA specific qPCR assay. *Scientific reports*. 2015; 5: 11590.
- Androvic P., Valihrach L., Elling J., Sjoback R., Kubista M. Two-tailed RT-qPCR: a novel method for highly accurate miRNA quantification. *Nucleic acids research*. 2017; 45 (15): e144.
- von Kleist S., Chany E., Burtin P., King M., Fogh J. Immunohistology of the antigenic pattern of a continuous cell line from a human colon tumor. *Journal of the National Cancer Institute*. 1975; 55 (3): 555-60.
- Hill S.M., Rodgers C.S., Hulten M.A., Wilson A.P. Cytogenetics of a cell line derived from an ovarian papillary serous cystadenocarcinoma. *Cancer genetics and cytogenetics*. 1984; 12 (4): 321-7.
- Kolesnikov N.N., Titov S.E., Veryaskina Yu.A., Vladimirova A.V., Samsonov R.B., Artem'eva A.S. et al. Increase of accuracy and informativeness of fine-needle aspiration puncture biopsy of breast tumors by means of microRNA analysis in the material of the cytological smear. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii*. 2016; 3 (1): 44-52. (in Russian)

Поступила 01.08.18

Принята к печати 04.10.18