

Оптимизация условий хранения РНК в биобанке, а также методов ручного и автоматизированного выделения РНК из цельной крови и лейкоцитарной фракции

Романюк С. А.¹, Попов О. С.¹, Сушенцева Н. Н.¹, Апалько С. В.¹, Полковникова И. А.¹, Щербак С. Г.^{1,2}

¹СПб ГБУЗ “Городская больница № 40”. Сестрорецк; ²Санкт-Петербургский государственный университет. Санкт-Петербург, Россия

Цель. Оптимизация методики выделения и хранения рибонуклеиновой кислоты (РНК) из цельной крови и лейкоцитарной фракции.

Материалы и методы. Сравнение качества выделения проводилось для образцов РНК, полученных из 228 образцов лейкоцитарной фракции и 198 образцов цельной крови. Выделение было проведено из свежих и замороженных образцов с помощью реагента ExtractRNA™ и автоматизированной станции MagNA Pure Compact. Были опробованы различные способы удаления эритроцитов — с помощью центрифугирования и обработки гемолитиками двух производителей, а также способы заморозки материала для последующего выделения РНК — с консервантами и без них.

Результаты. Была проверена 21 комбинация условий. Наиболее качественная РНК выделялась при ручной экстракции с использованием реагента ExtractRNA™ из свежей, очищенной гемолитиком “Амплисенс” лейкоцитарной фракции (успешность выделения — 94%, медиана RIN=8,4); замороженной в IntactRNA™, очищенной центрифугированием лейкоцитарной фракции (успешность выделения — 100%, медиана RIN =8); замороженной в ExtractRNA™, очищенной центрифугированием лейкоцитарной фракции (успешность выделения — 100%, медиана RIN =9,3).

Заключение. Из замороженных фракций крови возможно выделение РНК, не уступающей по качеству выделенной из свежих образцов. Таким образом, проводить выделение РНК сразу после поступления биологического материала не обязательно.

Ключевые слова: рибонуклеиновая кислота, биобанк, фенол-хлороформная экстракция, автоматизированное выделение рибонуклеиновой кислоты, хранение рибонуклеиновой кислоты.

Отношения и деятельность: нет.

Поступила 29/10-2021

Рецензия получена 16/11-2021

Принята к публикации 22/11-2021



Для цитирования: Романюк С. А., Попов О. С., Сушенцева Н. Н., Апалько С. В., Полковникова И. А., Щербак С. Г. Оптимизация условий хранения РНК в биобанке, а также методов ручного и автоматизированного выделения РНК из цельной крови и лейкоцитарной фракции. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2021;20(8):3105. doi:10.15829/1728-8800-2021-3105

Optimization of RNA storage in a biobank, as well as methods for manual and automated isolation of RNA from whole blood and leukocyte fraction

Romanyuk S. A.¹, Popov O. S.¹, Sushentseva N. N.¹, Apalko S. V.¹, Polkovnikova I. A.¹, Shcherbak S. G.^{1,2}

¹City Hospital № 40. Sestroretsk; ²Saint Petersburg State University. St. Petersburg, Russia

Aim. To optimize the technique for the isolation and storage of ribonucleic acid (RNA) from whole blood and leukocyte fraction.

Materials and methods. Comparison of isolation quality was carried out for RNA samples obtained from 228 leukocyte samples and 198 whole blood samples. Isolation was performed from fresh and frozen samples using ExtractRNA™ reagent and a MagNA Pure Compact automated system. Various methods of removing erythrocytes (centrifugation and treatment with hemolytic agents from two manufacturers) were tested, as well as freezing with and without preservatives for subsequent RNA isolation.

Results. Twenty-one combinations of conditions were tested. The highest quality RNA was isolated by manual extraction using the ExtractRNA™ reagent from a fresh leukocyte fraction, purified by the

Amplisens hemolytic agent (successful extraction — 94%, median RIN=8,4); frozen in IntactRNA™, purified by leukocyte fraction centrifugation (successful extraction — 100%, median RIN=8); frozen in ExtractRNA™, purified by leukocyte fraction centrifugation (successful extraction — 100%, median RIN=9,3).

Conclusion. RNA can be isolated from frozen blood fractions, which is not inferior in quality to that isolated from fresh samples. Thus, it is not necessary to isolate RNA immediately after the receipt of biological material.

Keywords: ribonucleic acid, biobank, phenol-chloroform extraction, automated ribonucleic acid isolation, ribonucleic acid storage.

Relationships and Activities: none.

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

e-mail: navicula@yandex.ru

Тел.: +7 (911) 159-83-03

[Романюк С. А. — биолог, ORCID: 0000-0002-4267-5941, Попов О. С. — специалист, ORCID: 0000-0003-1778-0165, Сушенцева Н. Н.* — биолог, ORCID: 0000-0002-5100-5229, Апалько С. В. — к.б.н., биолог, зав. лабораторией, ORCID: 0000-0002-3853-4185, Полковникова И. А. — биолог, ORCID: 0000-0002-9178-8512, Щербак С. Г. — д.м.н., главный врач, профессор, зав. кафедрой последипломного медицинского образования, ORCID: 0000-0001-5047-2792].

Romanyuk S. A. ORCID: 0000-0002-4267-5941, Popov O. S. ORCID: 0000-0003-1778-0165, Sushentseva N. N.* ORCID: 0000-0002-5100-5229, Apalko S. V. ORCID: 0000-0002-3853-4185, Polkovnikova I. A. ORCID: 0000-0002-9178-8512, Shcherbak S. G. ORCID: 0000-0001-5047-2792.

*Corresponding author: navicula@yandex.ru

Received: 29/10-2021

Revision Received: 16/11-2021

Accepted: 22/11-2021

For citation: Romanyuk S. A., Popov O. S., Sushentseva N. N., Apalko S. V., Polkovnikova I. A., Shcherbak S. G. Optimization of RNA storage in a biobank, as well as methods for manual and automated isolation of RNA from whole blood and leukocyte fraction. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2021;20(8):3105. (In Russ.) doi:10.15829/1728-8800-2021-3105

РНК — рибонуклеиновая кислота, RBCLB — Red Blood Cell Lysis Buffer, RIN — RNA Integrity Number (индекс целостности РНК).

Введение

На всех этапах биобанкирования рибонуклеиновой кислоты (РНК) необходимо учитывать чувствительность этой молекулы к действию нуклеаз и высокую предрасположенность к спонтанной структурной деградации. На качество образцов РНК влияют не только способы выделения, но и методики взятия, транспортировки, обработки и хранения исходного биологического материала, а также условия хранения выделенной РНК.

Выделению РНК из тканей посвящено много исследований и разработаны рекомендации (например, CEN/TS 16826-1:2015), в то время как большинство публикаций на тему выделения РНК из крови являются узконаправленными. В них рассматривают либо процесс экстракции общего пула РНК в рамках конкретного анализа, либо выделение отдельных ее типов: бактериальной или вирусной, а также микроРНК [1-4]. При этом работы, посвященные анализу методик выделения РНК, а в частности, сравнению автоматизированного и ручного выделения, выполнены на малых выборках образцов [2, 5]. В то же время кровь является потенциально ценным источником РНК при условии правильного выбора методик выделения, процессирования и хранения [6].

В последние годы разработаны специализированные системы забора крови в целях сохранения качества биологического материала для выделения РНК, такие как PAXgene™ (QIAGEN), Tempus™ (Invitrogen) и т.д. [7]. В случае использования универсальных пробирок для забора крови, в качестве оптимального антикоагулянта для образцов, предназначенных для последующего выделения нуклеиновых кислот, рекомендуется цитрат натрия [8].

Продолжительность и условия хранения крови и ее фракций между взятием и выделением РНК также оказывают влияние на качество выделенной РНК. РНК быстро деградирует при температуре >0° С, тенденция к распаду наблюдается даже в замороженных образцах цельной крови [9, 10]. При долгосрочном хранении тканей для последующего выделения РНК температура хранения должна быть не более -130° С [11]. Для сохранения качества

РНК также рекомендуется минимизировать количество циклов замораживания/оттаивания образцов биологического материала, предназначенного для выделения [12]. Некоторые исследователи рекомендуют альтернативные способы хранения с использованием консервантов [13]. Однако существуют предположения, что ингибиторы рибонуклеаз (РНКаз) и консерванты, такие как RNAlater™ (Invitrogen), могут исказить результаты транскриптомных исследований [8, 14, 15]. Кроме того, образцы цельной крови и изолированных клеток не рекомендуют хранить в RNAlater™ [16].

Данное исследование направлено на оптимизацию методики выделения и хранения РНК из цельной крови и лейкоцитарной фракции, которая может стать основой для разработки стандартизированных протоколов процессирования материала с целью повышения качества предоставляемых биобанком биообразцов. Кроме того, в задачи разрабатываемого протокола ставились минимизация затрат на его реализацию и доступность на территории РФ используемых в нем реактивов, преимущественно российских производителей.

Материал и методы

Используемый биоматериал. 228 образцов лейкоцитарной фракции и 198 образцов цельной крови были получены из коллекции биобанка СПб ГБУЗ “Городская больница № 40” в период 11.2018-03.2020гг. Все документы в рамках научно-исследовательского проекта “Биобанкирование и биомедицинские исследования образцов тканей и жидкостей человека” были одобрены Экспертным советом по этике СПб ГБУЗ “Городская больница № 40” на заседании № 119 от 09 февраля 2017г. Образцы крови были получены после подписания информированного согласия донорами биоматериала.

Выделение РНК проводилось в рамках 21 комбинации параметров выделения. Пять комбинаций были исключены из последующего анализа по причине недостаточного количества образцов. Сравнение качества выделения проводилось для образцов РНК, полученных из 224 образцов лейкоцитарной фракции и 184 образцов цельной крови в условиях 16 различных комбинаций параметров выделения (таблица 1).

Использование консервантов для хранения образцов перед выделением РНК. Образцы цельной крови в объ-

Таблица 1

Комбинации хранения и выделения РНК

Тип материала	Обработка	Заморозка	Выделение	№ [†]	n	Процент выделения [§]
Лейкоцитарная фракция	необработанные	свежая	MagNa Pure	1	34	32%
		без криоконсерванта		2	22	14%
			ExtractRNA	3	9	22%
	центрифугирование гемолитик (амплисенс)	90% FBS, 10% DMSO	MagNa Pure	4	9	44%
		свежая		5	102	81%
				6	10	0%
			ExtractRNA	7	16	94%
		без криоконсерванта	MagNa Pure	8	6	0%
			ExtractRNA	9	16	19%
Цельная Кровь	необработанные	свежая		10	8	0%
	гемолитик (амплисенс)			11	94	81%
	гемолитик (RBCLB)			12	27	85%
	гемолитик (амплисенс)	ExtractRNA	ExtractRNA	13	14	71%
			ExtractRNA c*	14	13	85%
		IntactRNA	ExtractRNA	15	14	57%
			ExtractRNA c*	16	14	57%

Примечание: * — осадок суспендирован, [†] — номер, присвоенный комбинации хранения и выделения РНК, [§] — процент от общего количества образцов в комбинации, соответствующий успешно выделенной РНК. DMSO — диметилсульфоксид, FBS — fetal bovine serum (фетальная бычья сыворотка).

еме 700 мкл были обработаны гемолитиком “Амплисенс” (ИнтерЛабСервис) согласно протоколу производителя. Каждый образец цельной крови был подготовлен в 4-х повторах для последующего замораживания разными способами. В 1-м варианте к клеточному осадку был добавлен 1 мл ExtractRNA™ (Евроген) без последующего перемешивания. Во 2-м варианте отмытый осадок был суспендирован в 1 мл ExtractRNA™. В 3-м варианте к осадку был добавлен 1 мл IntactRNA (Евроген) без последующего перемешивания. В 4-м варианте осадок был суспендирован в 1 мл IntactRNA.

В качестве криоконсерванта для образцов лейкоцитарной фракции была использована 90% FBS (fetal bovine serum, фетальная бычья сыворотка) с 10% DMSO (диметилсульфоксид). Также заморозку проводили в IntactRNA™ и ExtractRNA™. Замороженные образцы перед выделением РНК хранились при -80° С.

Выделение РНК. Выделение РНК проводилось из свежих (<6 ч со времени забора) и замороженных образцов цельной крови и лейкоцитарной фракции. Объем цельной крови составил 100 мкл при автоматизированном выделении на станции MagNa Pure Compact (Roche) и 700 мкл при ручной экстракции. Лейкоцитарную фракцию получали из 9 мл цельной крови.

Очистку образцов цельной крови и лейкоцитарной фракции от эритроцитов проводили с помощью гемолитика “Амплисенс” или RBCLB — Red Blood Cell Lysis Buffer (Roche), согласно протоколам производителей, либо центрифугированием лейкоцитарной фракции в течение 5 мин при 4500 g с последующим отбором супернатанта.

Экстракцию с использованием реагента ExtractRNA™ и на станции MagNa Pure Compact проводили согласно протоколам производителей. Объем элюции при автоматическом выделении составлял 100 мкл, при ручном выделении — 50 мкл.

Оценка качества выделенной РНК. Индекс целостности РНК (RIN — RNA Integrity Number) оценивался

на станции 4200 TapeStation (Agilent Technologies) с помощью набора RNA ScreenTape (Agilent Technologies). Оценка концентрации образцов проводилась с помощью набора QuantiFluor RNA System (Promega) на приборе Quantus™ Fluorometer (Promega). Чистота образцов РНК оценивалась с помощью отношения поглощения на длинах волн 260 и 280 нм ($A_{260/280}$) на приборе SPECTROstar Nano (BMG Labtech). Все процедуры оценки качества РНК проводились согласно инструкциям производителей.

Оценка влияния способа заморозки и количества циклов замораживания/оттаивания на качество образцов РНК. 12 образцов выделенной РНК были разделены на две равные аликвоты каждый. К одной аликвоте было добавлено 0,1 объема 3 М ацетата натрия pH 5,4, 3 объема 95% этилового спирта (Росбио) и 2 мкл PelletPaint® (Millipore). Обе аликвоты были заморожены при -150° С, затем все образцы были проведены через 5 циклов замораживания/оттаивания. Переосаждение образцов РНК, замороженных с PelletPaint®, проводилось согласно инструкции производителя. После каждого цикла была проведена оценка качества РНК.

Статистическая обработка данных. Статистический анализ проводился с использованием языка программирования с открытым исходным кодом R, версия 3.6.3. Для проверки соответствия выборок нормальному распределению использовался критерий Шапиро-Уилка. Статистические различия между комбинациями хранения РНК устанавливались с помощью точного теста Фишера. Различия между количественными переменными устанавливались при помощи критерия Краскела-Уоллиса, в качестве post-hoc анализа использовался критерий Данна с поправкой Холма-Бонферрони. Для кластеризации данных, согласно результатам выделения РНК (Концентрация РНК (Quantus), нг/мкл, $A_{260/280}$, RIN, успешность выделения) использовался метод k-средних ++ (kmeans++).

Таблица 2

Оценка качества выделения РНК

№*	Процент успешного выделения	Процент неуспешного выделения	Деградация РНК	Медиана RIN	Медиана концентрации РНК	Медиана $A_{260/280}$	Качество выделения (кластеры)
1	32%	35%	32%	3,8	50,3	1,805	плохое
2	14%	55%	32%	NA [†]	26,6	1,775	плохое
3	22%	44%	33%	5,85	27,9	1,49	плохое
4	44%	44%	11%	5,9	59,4	1,82	плохое
5	81%	5%	14%	7,55	61,65	1,79	хорошее
6	0%	100%	0%	3	21	1,79	плохое
7	94%	6%	0%	8,25	48,3	1,73	хорошее
8	0%	100%	0%	NA [†]	0,0365	1,585	плохое
9	19%	81%	0%	3,3	73,45	1,405	плохое
10	0%	100%	0%	4,2	4,8	1,72	плохое
11	81%	11%	9%	5,5	51,4	1,78	допустимое
12	85%	15%	0%	6,8	34,8	1,795	допустимое
13	71%	7%	21%	5,35	48,65	1,58	допустимое
14	85%	0%	15%	8,8	62,8	1,39	хорошее
15	57%	21%	21%	5,2	45,25	1,49	допустимое
16	57%	36%	7%	5,6	35,6	1,33	допустимое

Примечание: * — номер, присвоенный комбинации хранения и выделения РНК, [†] — при отсутствии данных по RIN, успешность выделения РНК оценивалась при помощи электрофореза в агарозном геле.

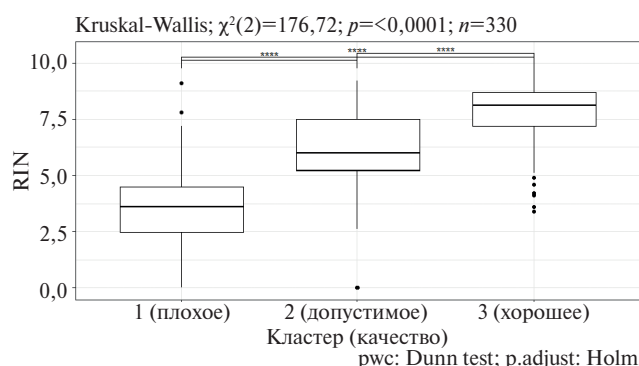


Рис. 1 Диаграмма размаха для RIN (кластеры).

Примечание: над изображением представлены результаты проверки гипотезы при помощи критерия Краскела-Уоллиса. Результат *post-hoc* анализа представлен символами, где **** — $p<0,0001$.

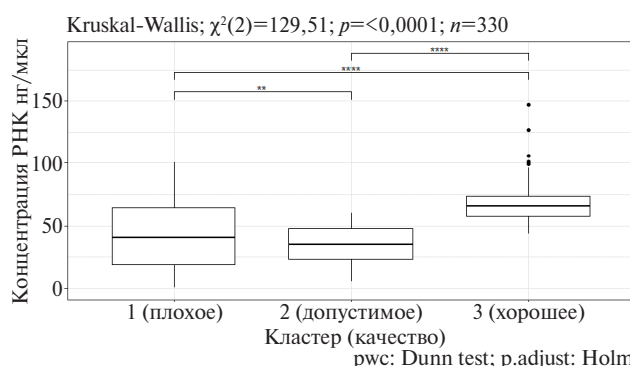


Рис. 2 Диаграмма размаха для концентрации РНК (Quantus), нг/мкл (кластеры).

Примечание: над изображением представлены результаты проверки гипотезы при помощи критерия Краскела-Уоллиса. Результат *post-hoc* анализа представлен символами, где **** — $p<0,0001$, ** — $p<0,01$.

Результаты

Сравнение результатов выделения РНК

В качестве переменных условий выделения РНК в рамках данного исследования были обозначены:

- материал для выделения (цельная кровь или лейкоцитарная фракция);
- процедуры по очистке образцов от эритроцитов (с помощью простого центрифугирования или с использованием гемолитиков двух производителей);
- способ хранения материала для выделения;
- метод выделения.

Среди исключенных комбинаций РНК наилучшего качества (медиана RIN — 9,3; медиана концентрации — 92,95 нг/мкл, медиана чистоты

($A_{260/280}$) — 1,75) была получена при выделении из образцов лейкоцитарной фракции, очищенных от эритроцитов центрифугированием и замороженных в ExtractRNA™ при выделении с помощью набора ExtractRNA™.

Исходя из значений параметров концентрация РНК, чистота ($A_{260/280}$) и RIN, выделенные образцы были разбиты на три кластера, условно обозначенные как “плохое” качество (1), “допустимое” качество (2), “хорошее” качество (3) (таблица 2). Комбинация методов выделения и хранения РНК соотносилась с определенным кластером согласно доле образцов по кластерам, если >50% образцов попадают в первый кластер, то комбинация маркировалась как комбинация с “плохим” качеством, если >50% образцов попадают в третий кластер, то

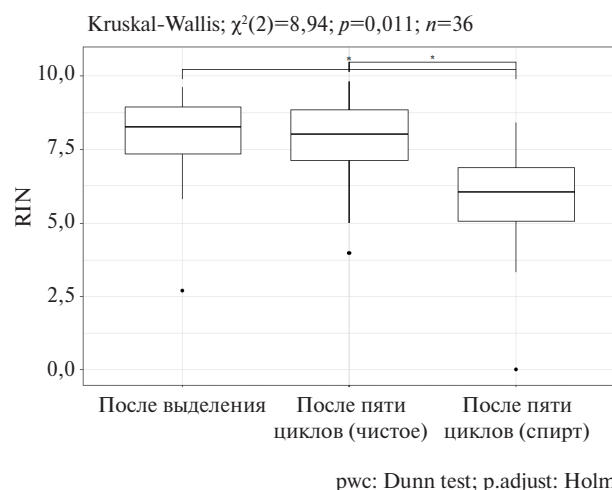


Рис. 3 Влияние повторного замораживания/оттаивания, а также условий хранения (под спиртом или без него) на образцы РНК (RIN).

Примечание: 12 образцов РНК были разделены на две аликвоты и заморожены в чистом виде или со спиртом, ацетатом натрия и PelletPaint®. Над изображением представлены результаты проверки гипотезы при помощи критерия Краскела-Уоллиса. Результат *post-hoc* анализа представлен символами, где * — $p < 0,05$.

комбинация маркировалась как “хорошая”, в иных случаях — как комбинация с “допустимым” качеством.

Кластер с “допустимым” и “хорошим” качеством содержит только те образцы, которые в результате были оценены как успешно выделенные. Концентрация РНК и RIN статистически различаются между всеми кластерами. При этом различия статистически значимы и в случае дисперсионного анализа, и в случае попарного сравнения групп (рисунки 1, 2).

Оценка влияния условий хранения очищенной РНК и циклов размораживания/оттаивания, на качество образцов

Повторное переосаждение РНК, замороженной под спиртом, приводит к значительному снижению концентрации образцов (рисунки 3, 4). Средняя разница в снижении концентрации для 12 образцов между замороженной чистой РНК и РНК, замороженной под спиртом, составила 25,8 нг/мкл (псевдомедиана, $p = 0,00038$, согласно критерию Манна-Уитни). При этом у 50% образцов РНК, замороженной под спиртом, в результате 5-кратного оттаивания с последующим переосаждением, концентрация составила < 1 нг/мкл. В большинстве образцов РНК, замороженных под спиртом, наблюдалась большая степень деградации после многократного замораживания и оттаивания в сравнении с образцами замороженной чистой РНК (псевдомедиана RIN = 1,99, $p = 0,01$).

Обсуждение

В качестве материалов для выделения РНК в рамках настоящего исследования были оценены

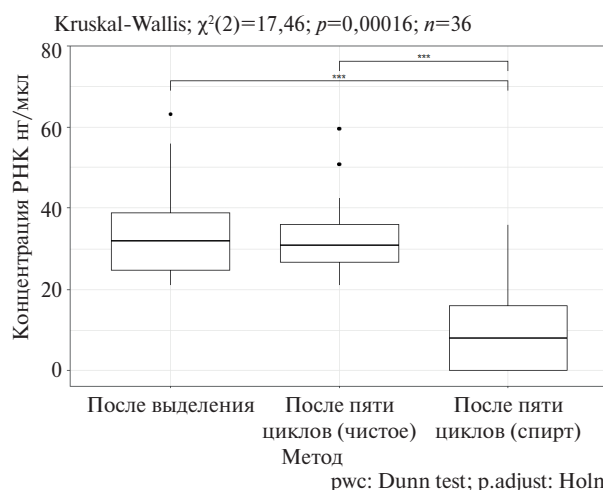


Рис. 4 Влияние повторного замораживания/оттаивания, а также условий хранения (под спиртом или без) на образцы РНК (концентрация).

Примечание: 12 образцов РНК были разделены на две аликвоты и заморожены в чистом виде или со спиртом, ацетатом натрия и PelletPaint®. Над изображением представлены результаты проверки гипотезы при помощи критерия Краскела-Уоллиса. Результат *post-hoc* анализа представлен символами, где *** — $p < 0,001$.

цельная кровь и лейкоцитарная фракция. Одной из задач было определить, возможно ли выделение качественной РНК из замороженных образцов крови и лейкоцитарной фракции, или же в условиях биобанка рекомендуется проводить выделение сразу при поступлении материала и хранить уже выделенные образцы РНК.

РНК хорошего качества с высоким процентом успешности выделения была получена в результате ручной экстракции с использованием реагента ExtractRNA™ российского производителя Евроген из следующих материалов: свежей, очищенной гемолитиком “Амплисенс” лейкоцитарной фракции (успешность выделения — 94%, медиана RIN = 8,4); замороженной в IntactRNA™, очищенной центрифугированием лейкоцитарной фракции (успешность выделения — 100%, медиана RIN = 8); замороженной в ExtractRNA™, очищенной центрифугированием лейкоцитарной фракции (успешность выделения — 100%, медиана RIN = 9,3).

Выделение из свежей цельной крови на станции MagNA Pure Compact было менее эффективным, чем выделение ручным методом из замороженных в IntactRNA™ и ExtractRNA™ образцов цельной крови, предварительно отмытой гемолитиком “Амплисенс” (таблица 2).

Следует отметить, что качественную РНК можно было получить из замороженного материала только при условии использования IntactRNA™ и ExtractRNA™. Это подразумевает дополнительные расходы при необходимости хранения большого количества образцов в биобанке. Некоторые исследования указывают на то, что консервант RNAlater™, аналогом которого является IntactRNA™, может

искажать результаты исследования транскриптома, т.к. не полностью ингибирует биологические процессы в тканях [15]. Однако влияние консервантов на живые клетки еще требует дополнительных исследований.

Значение $RIN > 8$ указывает на высокое качество РНК, оптимальное для последующих исследований [17]. В некоторых исследованиях показано, что качество РНК является достаточным для секвенирования и оценки экспрессии генов при $RIN > 5$ [10, 18]. В рамках настоящего исследования наиболее высокая медиана RIN (9,3) наблюдалось при выделении РНК из образцов свежей лейкоцитарной фракции, очищенной от эритроцитов гемолитиком (Амплисенс), с помощью реагента ExtractRNA™. В семи из восьми комбинаций, вошедших во второй и третий кластер (допустимое и хорошее качество выделения), был использован ручной метод выделения. Несмотря на высокое качество РНК, полученной при выделении ручными методами, в условиях биобанка с большим объемом поступающих образцов в целях улучшения стандартизации и эффективности рабочего процесса автоматизированное выделение может быть предпочтительным [19]. В рамках настоящего исследования один из методов (№ 5) выделения на MagNA Pure Compact (таблица 2) вошёл в кластер “хорошего” качества выделения и показал как достаточно высокое значение индекса целостности (медиана $RIN = 7,55$), так и высокий процент успешности выделения РНК — 81%.

Для исследований экспрессии генов важна не только целостность РНК, но и чистота образцов, при этом оптимальным считается значение $A_{260/280} > 1,8$ [20]. Несмотря на то, что в результате ручного выделения была получена РНК с большей концентрацией, чем при автоматизированном, медиана $A_{260/280}$ образцов, полученных ручным выделением, была ниже, чем при выделении на станции MagNA Pure Compact ($p < 0,001$). Это может указывать на загрязнение образцов органическими растворителями [19]. Поскольку при ручном выделении в используемом протоколе отсутствует этап обработки дезоксирибонуклеазой (ДНКазой), в выделенных образцах возможно присутствие ДНК, влияющей на значения концентрации и чистоты. Эта проблема может быть решена с помощью обработки выделенных образцов ДНКазой, однако в этом случае есть риск потерь материала и деградации РНК остаточными РНКазами [21].

Концентрация РНК при выделении из цельной крови и лейкоцитарной фракции обычно ниже, чем при выделении из тканей и культур клеток, что также влияет на значение $A_{260/280}$. При выделении на станции MagNA Pure Compact из цельной крови и лейкоцитарной фракции ожидаемые значения $A_{260/280}$ находятся в диапазоне 1,7–1,9. Также при элюции РНК в воде (как указано в протоколе

ExtractRNA™) значение $A_{260/280}$ на 0,3–0,4 единицы ниже, чем при элюции в слабощелочном буфере. Стоит учитывать, что многие спектрофотометры предполагают погрешность точности длины волны в ± 1 нм, что может повлиять на значение $A_{260/280}$ в пределах $\pm 0,2$ единиц.

Существенных различий в чистоте РНК, выделенной на станции MagNA Pure Compact из образцов отмытой свежей цельной крови в зависимости от используемого гемолитика (“Амплисенс” или RBCLB), не наблюдалось ($p = 0,29$), при этом оба метода выделения входили в один кластер — “допустимое” качество. Концентрация выделенной РНК при использовании RBCLB была ниже, чем при использовании гемолитика “Амплисенс” ($p = 0,001$), в то же время с RIN наблюдается обратный эффект: медиана RIN при использовании RBCLB была выше ($p = 0,01$).

Стоит отметить, что 100% успешность выделения РНК наблюдалась при ручном выделении из неочищенной лейкоцитарной фракции, замороженной в ExtractRNA™. Этот вариант был исключен из анализа результатов по причине недостаточного количества образцов. В дальнейшем требуется провести оценку количественных и качественных параметров РНК, выделенной таким методом, на более широкой выборке образцов.

Хранение РНК при -80°C является стандартным режимом, но в некоторых исследованиях указывают на деградацию РНК при -80°C и активность некоторых рибозимов даже при низких температурах [22, 23]. В настоящее время информации по влиянию более низких температур (хранение при $\leq -150^{\circ}\text{C}$) на сохранение образцов РНК недостаточно, однако известно, что большинство биохимических реакций прекращаются при температуре $< -135,2^{\circ}\text{C}$ [23, 24]. При хранении РНК требуется учитывать и другие факторы, например, то, что начальная концентрация РНК влияет на ее целостность при длительном хранении. Так, РНК с высокой концентрацией (250 нг/мкл) сохраняет целостность даже при хранении при -80°C [25]. При хранении РНК важно учитывать колебания температур, возникающие при открытии морозильных камер. Влияние флуктуаций уменьшается при использовании морозильных камер с температурой -150°C [26]. Данное исследование является одним из немногих, оценивающих влияние хранения при -150°C на качество образцов РНК. Вовсе избежать флуктуации температуры возможно при использовании автоматизированных криохранилищ.

Заключение

В результате проведенного исследования удалось подтвердить возможность выделения из замороженного материала РНК, не уступающей по качеству выделенной из свежих образцов. Таким

образом, в случае большого потока образцов в биобанке и недостатка временных, инфраструктурных или человеческих ресурсов, проводить выделение РНК сразу после поступления биологического материала не обязательно.

С помощью кластеризации удалось сгруппировать комбинации условий сразу по нескольким исследуемым признакам, в то время как простые статистические методы не позволяют найти статистически достоверных различий даже по одному из признаков. Например, точный критерий Фишера не показывает статистически достоверного различия как между 4 и 13 комбинациями ($p < 0,14$), так и между 7 и 13 комбинациями ($p < 0,16$). Кластеризация позволила выделить как надежные методы хранения и выделения РНК, так и потенциально надежные, требующие модификаций.

В условиях биобанка, подразумевающих многократное замораживание и размораживание об-

разцов в случае частичной передачи биоматериала исследователям, оптимально хранить РНК без спирта, т.к. при повторном переосаждении образцов, хранившихся под спиртом, наблюдались большие потери материала и его деградация. При хранении РНК под спиртом может быть рекомендовано предварительное разделение образцов на аликвоты. При хранении РНК без спирта значительных потерь качества при множественных размораживаниях не продемонстрировано. Таким образом, хранение растворов РНК в воде или буфере для элюции может сэкономить место в криохранилище из-за отсутствия необходимости разделять образцы на многочисленные аликвоты.

Отношения и деятельность: все авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Литература/References

1. Bayatti N, Cooper-Knock J, Bury JJ, et al. Comparison of blood RNA extraction methods used for gene expression profiling in amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One*. 2014;9:87508. doi:10.1371/journal.pone.0087508.
2. Knepp JH, Geahr MA, Forman MS, et al. Comparison of automated and manual nucleic acid extraction methods for detection of enterovirus RNA. *J Clin Microbiol*. 2003;41:3532-6. doi:10.1128/JCM.41.8.3532-3536.2003.
3. Kresse SH, Namløs HM, Lorenz S, et al. Evaluation of commercial DNA and RNA extraction methods for high-throughput sequencing of FFPE samples. *PLoS One*. 2018;13. doi:10.1371/journal.pone.0197456.
4. Hammerle-Fickinger A, Riedmaier I, Becker C, et al. Validation of extraction methods for total RNA and miRNA from bovine blood prior to quantitative gene expression analyses. *Biotechnol Lett*. 2010;32:35-44. doi:10.1007/s10529-009-0130-2.
5. Sung JK, Dix DJ, Thompson KE, et al. Effects of storage, RNA extraction, genechip type, and donor sex on gene expression profiling of human whole blood. *Clin Chem*. 2007;53:1038-45. doi:10.1373/clinchem.2006.078436.
6. Schwochow D, Serieys LEK, Wayne RK, et al. Efficient recovery of whole blood RNA — a comparison of commercial RNA extraction protocols for high-throughput applications in wildlife species. *BMC Biotechnol*. 2012;12:33. doi:10.1186/1472-6750-12-33.
7. Hantzsch M, Tolios A, Beutner F, et al. Comparison of whole blood RNA preservation tubes and novel generation RNA extraction kits for analysis of mRNA and miRNA profiles. *PLoS One*. 2014;9:e113298. doi:10.1371/journal.pone.0113298.
8. Elliott P, Peakman TC. The UK Biobank sample handling and storage protocol for the collection, processing and archiving of human blood and urine. *Int J Epidemiol*. 2008;37:234-44. doi:10.1093/ije/dym276.
9. Huang LH, Lin PH, Tsai KW, et al. The effects of storage temperature and duration of blood samples on DNA and RNA qualities. *PLoS One*. 2017;12:e0184692. doi:10.1371/journal.pone.0184692.
10. Shen Y, Li R, Tian F, et al. Impact of RNA integrity and blood sample storage conditions on the gene expression analysis. *Oncotargets Ther*. 2018;11:3573-81. doi:10.2147/OTT.S158868.
11. Mendy M, Caboux E, Lawlor RT, et al. Common Minimum Technical Standards and Protocols for Biobanks Dedicated to Cancer Research. IARC Technical Publication, No 44. Lyon (FR): International Agency for Research on Cancer; 2017. ISBN: 978-92-832-2463-1.
12. Coppola L, Cianflone A, Grimaldi AM, et al. Biobanking in health care: Evolution and future directions. *J Transl Med*. 2019;17. doi:10.1186/s12967-019-1922-3.
13. Hentze JL, Kringelbach TM, Novotny GW, et al. Optimized Biobanking Procedures for Preservation of RNA in Tissue: Comparison of Snap-Freezing and RNAlater-Fixation Methods. *Biopreserv Biobank*. 2019;17:562-9. doi:10.1089/bio.2019.0028.
14. Ozkan H, Kerman E. Comparative Evaluation of RNAlater Solution and Snap Frozen Methods for Gene Expression Studies in Different Tissues. *Rev Rom Med Lab*. 2020;28:287-97. doi:10.2478/rrlm-2020-0024.
15. Passow CN, Kono TJ, Stahl BA, et al. RNAlater and flash freezing storage methods nonrandomly influence observed gene expression in RNAseq experiments. *bioRxiv*. 2018:379834. doi:10.1101/379834.
16. Chatterjee A., Ahn A., Rodger E. J., Stockwell P. A., Eccles M. R. (2018) A Guide for Designing and Analyzing RNA-Seq Data. In: Raghavachari N., Garcia-Reyero N. (eds) *Gene Expression Analysis. Methods in Molecular Biology*, Vol 1783:35-80. Humana Press, New York, NY. doi:10.1007/978-1-4939-7834-2_3.
17. Duale N, Lipkin WI, Briesse T, et al. Long-term storage of blood RNA collected in RNA stabilizing Tempus tubes in a large biobank — Evaluation of RNA quality and stability. *BMC Res Notes*. 2014;7:633. doi:10.1186/1756-0500-7-633.
18. Opitz L, Salinas-Riester G, Grade M, et al. Impact of RNA degradation on gene expression profiling. *BMC Med Genomics*. 2010;3:36. doi:10.1186/1755-8794-3-36.
19. Gaignaux A, Ashton G, Coppola D, et al. A Biospecimen Proficiency Testing Program for Biobank Accreditation: Four Years of Experience. *Biopreserv Biobank*. 2016;14:429-39. doi:10.1089/bio.2015.0108.
20. Becker C, Hammerle-Fickinger A, Riedmaier I, et al. mRNA and microRNA quality control for RT-qPCR analysis. *Methods*. 2010;50:237-43. doi:10.1016/j.jymeth.2010.01.010.

21. Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): Trends and problems. *J Mol Endocrinol.* 2002;29:23-39. doi:10.1677/jme.0.0290023.
22. Fabre AL, Colotte M, Luis A, et al. An efficient method for long-term room temperature storage of RNA. *Eur J Hum Genet.* 2014;22:379-85. doi:10.1038/ejhg.2013.145.
23. Hubel A, Spindler R, Skubitz APN. Storage of human biospecimens: Selection of the optimal storage temperature. *Biopreserv Biobank.* 2014;12:165-75. doi:10.1089/bio.2013.0084.
24. Mazur P. Cryobiology: The freezing of biological systems. *Science.* 1970;168:939-49. doi:10.1126/science.168.3934.939.
25. Olivieri EHR, De Andrade Franco L, Pereira RG, et al. Biobanking practice: RNA storage at low concentration affects integrity. *Biopreserv Biobank.* 2014;12:46-52. doi:10.1089/bio.2013.0056.
26. Shabihkhani M, Lucey GM, Wei B, et al. The procurement, storage, and quality assurance of frozen blood and tissue biospecimens in pathology, biorepository, and biobank settings. *Clin Biochem.* 2014;47:258-66. doi:10.1016/j.clinbiochem.2014.01.002.