

Оптимизация протокола приготовления библиотек для секвенирования циркулирующих микроРНК плазмы и сыворотки

Киселева А. В.¹, Сотникова Е. А.¹, Жарикова А. А.^{1,2}, Куценко В. А.¹, Борисова А. Л.¹, Шальнова С. А.¹, Ершова А. И.¹, Мешков А. Н.¹, Драпкина О. М.¹

¹ФГБУ "Национальный медицинский исследовательский центр терапии и профилактической медицины" Минздрава России. Москва; ²ФГБОУ ВО "Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова". Москва, Россия

Цель. Оптимизировать протокол приготовления библиотек для секвенирования микроРНК (малые некодирующие молекулы рибонуклеиновой кислоты) на основе коммерческого набора QIAseq miRNA UDI Library Kit для повышения качества получаемых данных.

Материал и методы. Образцы плазмы и сыворотки крови четырех участников исследования были отобраны из коллекции биобанка ФГБУ "НМИЦ ТПМ" Минздрава России. Выделение рибонуклеиновой кислоты (РНК) проводилось для каждого образца параллельно из 200 и 300 мкл. Из каждого образца РНК с помощью набора QIAseq miRNA UDI Library Kit были приготовлены две библиотеки для секвенирования по двум вариантам протокола производителя: для 1 нг РНК с уменьшенным числом циклов амплификации и для 10 нг РНК. Секвенирование проводилось на NextSeq 550.

Результаты. При сравнении групп образцов, приготовленных с использованием разных версий протокола, статистически значимо различались показатели тегов на млн прочтений (TPM, tags per million reads) на образец по генам человека (версия ENCODE v47) и по генам микроРНК ($p < 0,001$).

Заключение. Показано, что при использовании биообразцов плазмы и сыворотки крови основным параметром, влияющим на более высокие показатели секвенирования микроРНК, является уменьшение количества циклов полимеразной цепной реакции при приготовлении библиотек.

Ключевые слова: микроРНК, малые некодирующие РНК, плазма, сыворотка, секвенирование следующего поколения, оптимизация.

Отношения и деятельность. Государственное задание "Свободно циркулирующие микроРНК плазмы крови как диагностические и прогностические биомаркеры ИБС".

Поступила 25/08-2025

Рецензия получена 22/09-2025

Принята к публикации 23/09-2025



Для цитирования: Киселева А. В., Сотникова Е. А., Жарикова А. А., Куценко В. А., Борисова А. Л., Шальнова С. А., Ершова А. И., Мешков А. Н., Драпкина О. М. Оптимизация протокола приготовления библиотек для секвенирования циркулирующих микроРНК плазмы и сыворотки. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2025;24(11):4557. doi: 10.15829/1728-8800-2025-4557. EDN: DVGAAG

Optimization of a library preparation protocol for sequencing circulating plasma and serum microRNAs

Kiseleva A. V.¹, Sotnikova E. A.¹, Zharikova A. A.^{1,2}, Kutsenko V. A.¹, Borisova A. L.¹, Shalnova S. A.¹, Ershova A. I.¹, Meshkov A. N.¹, Drapkina O. M.¹

¹National Medical Research Center for Therapy and Preventive Medicine. Moscow; ²Lomonosov Moscow State University. Moscow, Russia

Aim. To optimize a library preparation protocol for sequencing small non-coding ribonucleic acids (microRNAs) based on the commercial QIAseq miRNA UDI Library Kit to improve the quality of the obtained data.

Material and methods. Plasma and serum samples from four study participants were collected from the biobank collection of the National Medical Research Center for Therapeutic and Preventive Medicine. Ribonucleic acid (RNA) was isolated for each sample in parallel, using

200 and 300 μ l aliquots. Two sequencing libraries were prepared from each RNA sample using the QIAseq miRNA UDI Library Kit by two manufacturer's protocol versions as follows: one for 1 ng of RNA with a reduced number of amplification cycles and one for 10 ng of RNA. Sequencing was performed on a NextSeq 550.

Results. When comparing groups of samples prepared using different protocol versions, there was a significant difference in the tags

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

e-mail: sanyutabe@gmail.com

[Киселева А. В.* — к.б.н., руководитель лаборатории молекулярной генетики Института персонализированной терапии и профилактики, в.н.с., ORCID: 0000-0003-4765-8021, Сотникова Е. А. — с.н.с. лаборатории молекулярной генетики Института персонализированной терапии и профилактики, ORCID: 0000-0002-8395-4146, Жарикова А. А. — к.б.н., в.н.с. лаборатории молекулярной генетики Института персонализированной терапии и профилактики, старший преподаватель факультета биоинженерии и биоинформатики, ORCID: 0000-0003-0723-0493, Куценко В. А. — к.ф.-м.н., с.н.с. лаборатории биostatистики отдела эпидемиологии хронических неинфекционных заболеваний, ORCID: 0000-0001-9844-3122, Борисова А. Л. — руководитель лаборатории "Банк биологического материала" Института персонализированной терапии и профилактики, ORCID: 0000-0003-4020-6647, Шальнова С. А. — д.м.н., профессор, руководитель отдела эпидемиологии хронических неинфекционных заболеваний, ORCID: 0000-0003-2087-6483, Ершова А. И. — д.м.н., зам. директора по фундаментальной науке, руководитель лаборатории клиномики, ORCID: 0000-0001-7989-0760, Мешков А. Н. — д.м.н., руководитель Института персонализированной терапии и профилактики, ORCID: 0000-0001-5989-6233, Драпкина О. М. — д.м.н., профессор, академик РАН, директор, ORCID: 0000-0002-4453-8430].

Адреса организаций авторов: ФГБУ "Национальный медицинский исследовательский центр терапии и профилактической медицины" Минздрава России, Петровверигский пер., д. 10, стр. 3, Москва, 101990, Россия; ФГБОУ ВО "Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова", Ленинские горы, д. 1, Москва, 119991, Россия.

Addresses of the authors' institutions: National Medical Research Center for Therapy and Preventive Medicine of the Ministry of Health of the Russian Federation, Petroverigsky Lane, 10, bld. 3, Moscow, 101990, Russia; Lomonosov Moscow State University, Leninskiye Gory, 1, Moscow, 119234, Russia.

per million reads (TPM) per sample for human (ENCODE v47) and microRNA genes ($p < 0,001$).

Conclusion. We showed that when using plasma and serum biosamples, the main parameter influencing higher microRNA sequencing rates is a reduction in the number of polymerase chain reaction cycles during library preparation.

Keywords: microRNA, small non-coding RNA, plasma, serum, next-generation sequencing, optimization.

Relationships and Activities. State assignment "Circulating MicroRNAs in Plasma as Diagnostic and Prognostic Biomarkers of CAD".

Kiseleva A. V.* ORCID: 0000-0003-4765-8021, Sotnikova E. A. ORCID: 0000-0002-8395-4146, Zharikova A. A. ORCID: 0000-0003-0723-0493, Kutsenko V. A. ORCID: 0000-0001-9844-3122, Borisova A. L. ORCID: 0000-0003-4020-6647, Shalnova S. A. ORCID: 0000-0003-2087-6483,

Ershova A. I. ORCID: 0000-0001-7989-0760, Meshkov A. N. ORCID: 0000-0001-5989-6233, Drapkina O. M. ORCID: 0000-0002-4453-8430.

*Corresponding author:
sanyutabe@gmail.com

Received: 25/08-2025

Revision Received: 22/09-2025

Accepted: 23/09-2025

For citation: Kiseleva A. V., Sotnikova E. A., Zharikova A. A., Kutsenko V. A., Borisova A. L., Shalnova S. A., Ershova A. I., Meshkov A. N., Drapkina O. M. Optimization of a library preparation protocol for sequencing circulating plasma and serum microRNAs. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2025;24(11):4557. doi: 10.15829/1728-8800-2025-4557. EDN: DVGA AK

микроРНК — малые некодирующие молекулы рибонуклеиновой кислоты, ПЦР — полимеразная цепная реакция, РНК — рибонуклеиновая кислота, ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота, NGS — next generation sequencing (секвенирование следующего поколения), PCA — principal component analysis (анализ главных компонент), TPM — tags per million reads (теги на миллион прочтений), UMI — unique molecular identifiers (уникальные молекулярные идентификаторы).

Ключевые моменты

Что известно о предмете исследования?

- Секвенирование следующего поколения обеспечивает высокую чувствительность и специфичность, а также возможность количественного определения и обнаружения новых малых некодирующих молекул рибонуклеиновой кислоты (микроРНК).
- Приготовление библиотек для секвенирования микроРНК может значительно влиять на получаемые результаты, в т.ч. на покрытие и спектр детектируемых микроРНК.

Что добавляют результаты исследования?

- При использовании в исследовании биообразцов с низким содержанием микроРНК оптимизация протокола приготовления библиотек для секвенирования может значительно улучшить получаемые результаты.

Key messages

What is already known about the subject?

- Next-generation sequencing provides high sensitivity and specificity, as well as the ability to quantify and detect new small non-coding ribonucleic acids (microRNAs).
- Library preparation for microRNA sequencing can significantly impact the results obtained, including the coverage and profile of detected microRNAs.

What might this study add?

- When using low miRNA content biosamples in research, optimization of the sequencing library preparation protocol can significantly improve the results obtained.

Введение

Малые некодирующие молекулы рибонуклеиновой кислоты (микроРНК) относятся к малым некодирующим рибонуклеиновым кислотам (РНК) (длина ~22 нуклеотида) и участвуют в регуляции экспрессии генов [1]. Циркулирующие микроРНК плазмы и сыворотки крови защищены от деградации с помощью включения в экзосомы и микровезикулы, или же связью с белковыми комплексами [2]. В настоящее время наблюдается значительный рост количества исследований, посвященных изучению потенциала циркулирующих микроРНК в качестве биомаркеров различных заболеваний [3-5].

Накопленные научные данные демонстрируют существенное влияние на профиль циркулирующих микроРНК преаналитических и ана-

литических факторов, таких как использование биологических образцов разных типов, различных методических подходов, а также отсутствие единых стандартов проведения исследований [6-9].

Секвенирование следующего поколения (NGS, next-generation sequencing) — метод, обеспечивающий высокую чувствительность и специфичность, а также возможность количественного определения и обнаружения новых микроРНК [10]. Этап приготовления библиотек для секвенирования микроРНК может значительно влиять на получаемые результаты, в т.ч. может отражаться на таких параметрах, как покрытие и спектр детектируемых микроРНК [11, 12].

На сегодняшний день на рынке представлен ряд коммерческих наборов для подготовки библио-

тек микроРНК [10, 11, 13-17]. Среди них одним из наиболее широко используемых и цитируемых в научных публикациях является набор QIAseq miRNA UDI Library Kit (Qiagen, Германия) (далее — QIAseq), важной особенностью которого является наличие уникальных молекулярных идентификаторов (unique molecular identifiers, UMI), позволяющих детектировать дубли, возникающие в ходе полимеразной цепной реакции (ПЦР). Библиотеки, полученные с помощью набора QIAseq, характеризуются большим разнообразием выявляемых микроРНК, высоким количеством сырых чтений и процентом чтений, картированных на гены микроРНК, а также относительно низким уровнем технических артефактов и более высокой корреляцией с данными количественной ПЦР [10, 11, 13, 15-17].

Несмотря на наличие стандартизированных протоколов от производителей, исследования последних лет демонстрируют, что оптимизация отдельных этапов подготовки библиотек может существенно повысить качество и воспроизводимость данных секвенирования [12, 18]. Это особенно актуально при работе с образцами из коллекций биобанков, хранившихся в течение длительного времени, поскольку их качество и степень деградации нуклеиновых кислот могут варьироваться в зависимости от условий хранения и особенностей пробоподготовки [7, 8]. Таким образом, даже при использовании коммерчески доступных решений адаптация методики под конкретные исследовательские задачи остается важным аспектом получения достоверных результатов.

Цель настоящего исследования — оптимизировать протокол приготовления библиотек для секвенирования микроРНК на основе коммерческого набора QIAseq miRNA UDI Library Kit для повышения качества получаемых данных.

Материал и методы

Биообразцы. В исследование были включены биообразцы четырех пациентов категории очень высокого сердечно-сосудистого риска из коллекции биобанка ФГБУ "НМИЦ ТПМ" Минздрава России [19]. Забор венозной крови был проведен в 2013-2014гг. Исследование одобрено Независимым Этическим Комитетом ФГБУ "НМИЦ ТПМ" Минздрава России (протокол № 07-03/12 от 03.07.2012). Все участники дали письменное информированное согласие.

Для получения плазмы кровь собирали в пробирки с антикоагулянтом (K_2 ЭДТА), а для сыворотки — в пробирки с разделительным гелем, после чего оставляли при комнатной температуре на 30 мин с последующим центрифугированием в течение 15 мин при 1200 g при +4 °С, а затем отбирали плазму и сыворотку. Далее все образцы хранились в биобанке при температуре -70 °С.

Выделение РНК. В 2025г из образцов была выделена тотальная РНК, включая микроРНК. До выделения РНК образцы плазмы и сыворотки после разморозки были подвергнуты центрифугированию при 16000 g в течение

15 мин при +4 °С. Супернатант был перенесен в новые пробирки, свободные от нуклеаз. Для выделения был использован набор miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit (Qiagen, Германия). Для каждого типа образца РНК была выделена параллельно дважды из одной и той же аликвоты плазмы или сыворотки — из 200 и из 300 мкл.

После выделения концентрацию микроРНК измеряли с помощью набора Qubit microRNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, США) на флуориметре Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific, США).

Секвенирование следующего поколения. Из каждого из образцов РНК (плазма/сыворотка, 200 мкл/300 мкл) с помощью QIAseq miRNA UDI Library Kit (Qiagen, Германия) были приготовлены две библиотеки для секвенирования по двум вариантам протокола производителя: для 1 нг РНК с уменьшенным числом циклов ПЦР (22 цикла) и для 10 нг РНК (19 циклов ПЦР).

Для оценки качества приготовленных библиотек определяли их концентрацию на флуориметре Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific, США) с помощью набора Qubit 1X dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, США) и длину на Bioanalyzer 2100 (Agilent, США) согласно протоколам производителей. NGS было проведено на NextSeq 550 (Illumina, США) по протоколу High Output 1×75 п.н.

Биоинформатический анализ. Обработка UMI проводилась с использованием пакета UMI-tools [20]. Чтения длиной не <14 нуклеотидов были отфильтрованы программой cutadapt [21]. Одноконцевые чтения (fastq) выравнивались на референсный геном GRCh38 с помощью STAR (версия 2.7.10a_alpha_220506) [22]. Далее файлы с выравниванием сортировались и индексировались с использованием Samtools [23]. Аннотирование генов выполнялось программой featureCounts (v2.0.1) [24] с учетом цепь-специфичности и параметрами: -O--largestOverlap -s 1 -t gene -g gene_id. Использовалась аннотация ENCODE v47 [25]. Визуализация данных осуществлялась пакетом ggplot2 в среде R [26].

Статистический анализ. Статистический анализ проводился в среде R 4.2. Непрерывные параметры представлены в виде медианы и интерквартильного размаха (Me [Q25; Q75]); дискретные — в виде абсолютных значений и относительных частот. Анализ главных компонент (PCA, principal component analysis) выполнялся для центрированных и нормированных данных. Оценка различий между двумя зависимыми выборками проведена при помощи критерия Вилкоксона. Поправка на множественные сравнения проведена методом Холма. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Дизайн исследования

При проведении пилотного секвенирования микроРНК с использованием биообразцов с длительным сроком хранения был выявлен ряд проблем, в т.ч. низкая концентрация получаемых библиотек, большое количество димеров адаптеров, выявляемое на этапе контроля качества библиотек, малое количество чтений на образец (<5 млн). Ранее было показано, что, увеличив исходное количество РНК при приготовлении библиотек и снизив количество циклов ПЦР для уменьшения количества

Таблица 1

Описание образцов в исследовании

Тип образца	Объем образца, из которого выделяли РНК, мкл	Протокол приготовления библиотек	Названия образцов
Сыворотка (S), n=16	200, n=8	для 1 нг РНК, 22 цикла ПЦР (v1), n=4	n1_S200_v1-n4_S200_v1
		для 10 нг РНК, 19 циклов ПЦР (v10), n=4	n1_S200_v10-n4_S200_v10
	300, n=8	для 1 нг РНК, 22 цикла ПЦР (v1), n=4	n1_S300_v1-n4_S300_v1
		для 10 нг РНК, 19 циклов ПЦР (v10), n=4	n1_S300_v10-n4_S300_v10
Плазма (PE), n=16	200, n=8	для 1 нг РНК, 22 цикла ПЦР (v1), n=4	n1_PE200_v1-n4_PE200_v1
		для 10 нг РНК, 19 циклов ПЦР (v10), n=4	n1_PE200_v10-n4_PE200_v10
	300, n=8	для 1 нг РНК, 22 цикла ПЦР (v1), n=4	n1_PE300_v1-n4_PE300_v1
		для 10 нг РНК, 19 циклов ПЦР (v10), n=4	n1_PE300_v10-n4_PE300_v10

Примечание: РНК — рибонуклеиновая кислота, ПЦР — полимеразная цепная реакция.

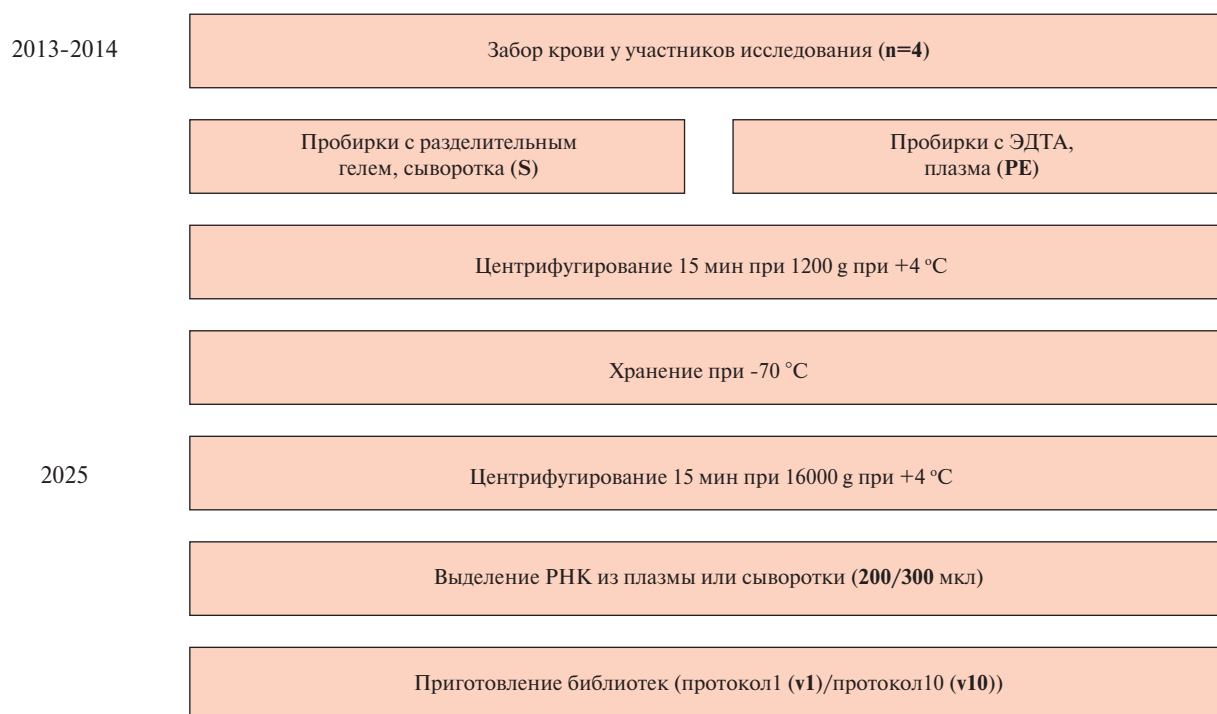


Рис. 1 Дизайн исследования.

Примечание: суффикс "S" обозначает сыворотку, "PE" — плазму с ЭДТА, "200" или "300" — объем исходного биообразца перед выделением РНК, "v1" или "v10" — версия протокола для приготовления библиотек; РНК — рибонуклеиновая кислота, ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота.

димеров адаптеров, можно улучшить показатели качества при секвенировании [12]. Одним из способов увеличения количества получаемой при выделении РНК является увеличение используемого объема плазмы или сыворотки, поэтому помимо стандартного объема в 200 мкл, мы использовали объем 300 мкл, выбор которого обусловлен тем, что он не приводил к увеличению времени выделения из-за ограничения, накладываемого ёмкостью колонки.

Производитель предлагает пять версий протокола QIAseq, как для ручного, так и автоматического исполнения, различающихся между собой в зависимости от исходного количества микроРНК (500 нг, 100 нг, 10 нг, 1 нг, 5 мкл элюата для сыво-

ротки или плазмы), по степени разбавления адаптеров и праймеров, а также по количеству циклов ПЦР. В качестве возможных альтернатив использовали модифицированный вариант для 1 нг с уменьшенным количеством циклов ПЦР: 3' адаптер — 1:20; 5' адаптер — 1:10; праймер — 1:20; 22 цикла, далее "протокол-1нг". Также использовали модифицированный вариант и для 10 нг: 3' адаптер — 1:5; 5' адаптер — 1:2,5; праймер — 1:5; 19 циклов, далее "протокол-10нг". Протокол для сыворотки/плазмы ("Serum/Plasma2), используемый изначально, отличается от версии для 10 нг только количеством циклов ПЦР (22 цикла), поэтому он не рассматривался далее для оптимизации.

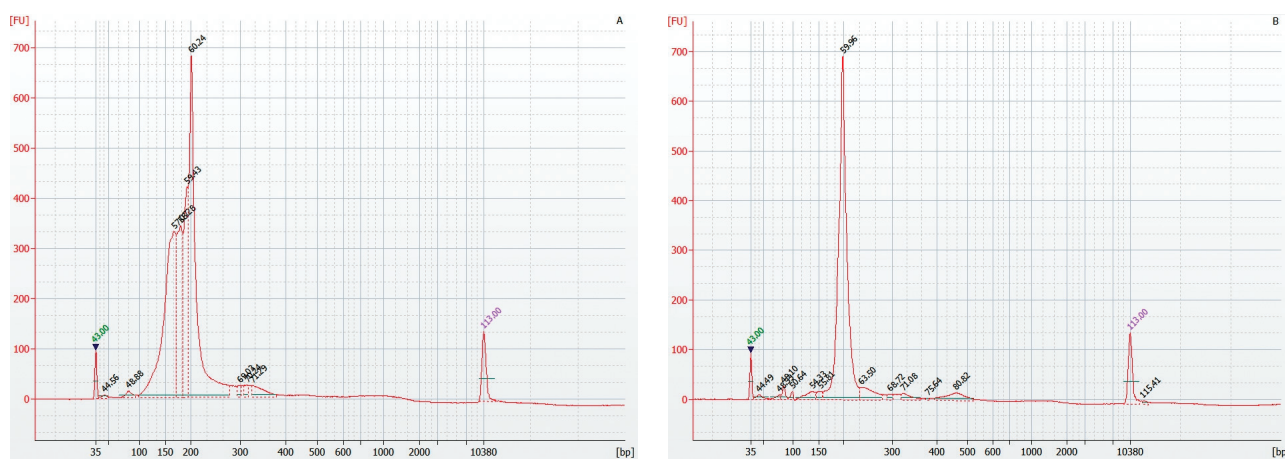


Рис. 2 Капиллярный электрофорез библиотек для секвенирования микроРНК одного и того же образца, приготовленных с использованием индексов из набора А и В, соответственно.

Примечание: bp — base pairs (пара нуклеотидов), FU — fluorescent units (единицы флуоресценции); микроРНК — малые некодирующие молекулы рибонуклеиновой кислоты.

Таблица 2

Характеристика исследуемых групп

Показатель, Me [Q25; 75]	S200_v1, n=4	S200_v10, n=4	S300_v1, n=4	S300_v10, n=4	PE200_v1, n=4	PE200_v10, n=4	PE300_v1, n=4	PE300_v10, n=4
Концентрация микроРНК, нг/мкл	2,3 [1,7; 3,1]	2,3 [1,7; 3,1]	3,5 [2,3; 5,5]	3,5 [2,3; 5,5]	1,3 [1,1; 1,5]	1,3 [1,1; 1,5]	2,2 [1,8; 2,4]	2,2 [1,8; 2,4]
Концентрация библиотек, нг/мкл	0,75 [0,61; 0,80]	0,99 [0,62; 1,4]	1,3 [0,87; 1,9]	1,3 [1,1; 1,3]	1,1 [0,81; 1,4]	0,9 [0,61; 1,8]	1,8 [1,43; 2,2]	1,9 [1,8; 2,1]
Исходное количество микроРНК, нг	11,4 [8,5; 15,3]	11,4 [8,5; 15,3]	17,3 [1,5; 27,4]	17,3 [1,5; 27,4]	6,7 [5,5; 7,6]	6,7 [5,5; 7,6]	11,1 [8,9; 12,0]	11,1 [8,9; 12,0]
Количество чтений на образец (размер библиотеки), млн	2,4 [2,1; 2,8]	2,3 [1,6; 2,9]	2,8 [2,6; 2,9]	2,8 [2,5; 3,0]	2,7 [2,5; 2,9]	2,6 [2,4; 3,1]	3,1 [2,8; 3,2]	3,4 [3,2; 3,6]
Количество чтений длиной >14 нуклеотидов после удаления UMI дубликатов, млн	1,9 [1,7; 2,2]	1,7 [1,1; 2,2]	2,048 [1,8; 2,3]	1,9 [1,7; 2,1]	2,0 [1,9; 2,1]	1,8 [1,8; 2,0]	2,2 [1,9; 2,5]	2,3 [2,1; 2,4]
Количество картированных чтений, млн	1,6 [1,4; 1,6]	1,3 [0,7; 1,8]	1,7 [1,4; 1,8]	1,5 [1,3; 1,6]	1,3 [1,2; 1,5]	1,3 [1,2; 1,5]	1,4 [1,2; 1,5]	1,5 [1,3; 1,5]
Количество картированных чтений, попавших в границы генов*, млн	0,087 [0,071; 0,11]	0,15 [0,097; 0,22]	0,15 [0,078; 0,12]	0,21 [0,13; 0,28]	0,13 [0,12; 0,17]	0,24 [0,19; 0,28]	0,12 [0,09; 0,17]	0,23 [0,22; 0,25]
TRM на образец (по генам человека) [†]	0,013 [0,005; 0,021]	0,030 [0,015; 0,047]	0,016 [0,011; 0,027]	0,04 [0,030; 0,067]	0,024 [0,013; 0,039]	0,059 [0,033; 0,098]	0,035 [0,030; 0,041]	0,14 [0,11; 0,15]
TRM на образец (по генам микроРНК)	84,5 [68,3; 90,6]	187,5 [174,5; 215,6]	92,7 [71,6; 109,7]	275,7 [237,8; 291,3]	77,4 [73,1; 78,9]	216,0 [209,1; 218,7]	65,7 [57,0; 72,2]	201,4 [188,7; 214,1]
Количество экспрессированных микроРНК (≥2 чтений на микроРНК)	114,5 [106,0; 127,3]	155,0 [140,3; 168,5]	135,5 [174,5; 215,6]	162,5 [151,8; 166,3]	131,0 [124,3; 141,3]	160,0 [156,3; 163,5]	117,0 [100,8; 136,3]	152,5 [148,5; 157,8]
Количество экспрессированных микроРНК (>5 чтений на микроРНК)	31,5 [29,3; 34,3]	56,5 [38,5; 75,5]	40,5 [33,3; 48,0]	64,0 [48,8; 76,0]	38,5 [35,5; 45,5]	58,0 [53,3; 68,5]	32,0 [23,8; 43,5]	51,5 [49,0; 56,5]

Примечание: * — рассчитано для генов, на которые картировано хотя бы 2 чтения и как минимум в четверти образцов из выборки, [†] — версия ENCODE v47; микроРНК — малые некодирующие молекулы рибонуклеиновой кислоты, Me — медиана [интерквартильный размах], TRM — tags per million reads (теги на млн прочтений), UMI — unique molecular identifiers (уникальные молекулярные идентификаторы).

Таблица 3

Характеристика объединенных групп

Показатель, Me [Q25; 75]	S, n=16	PE, n=16	p S vs PE	200, n=16	300, n=16	p 200 vs 300	v1, n=16	v10, n=16	p v1vs10
Концентрация микроРНК, нг/мкл	2,7 [1,7; 3,9]	1,6 [1,2; 2,1]	0,002*	1,7 [1,4; 2,0]	2,4 [1,9; 3,0]	<0,001*	1,9 [1,5; 2,6]	1,9 [1,5; 2,6]	—
Концентрация библиотек, нг/мкл	0,92 [0,68; 1,3]	1,6 [0,81; 1,93]	0,065	0,82 [0,66; 1,3]	1,69 [1,2; 1,9]	0,058	0,92 [0,70; 1,7]	1,28 [0,71; 1,9]	0,98
Исходное количество микроРНК, нг	13,4 [8,5; 19,7]	8,0 [5,8; 10,7]	0,002*	8,3 [6,9; 10,0]	12,2 [9,6; 15,1]	<0,001*	9,5 [7,4; 13,1]	9,5 [7,4; 13,1]	—
Количество чтений на образец (размер библиотеки), млн	2,7 [2,1; 2,9]	3,0 [2,6; 3,3]	0,013	2,7 [2,2; 2,9]	3,0 [2,7; 3,3]	0,051	2,8 [2,2; 3,1]	2,9 [2,4; 3,3]	0,86
Количество чтений длиной >14 нуклеотидов после удаления УМИ дубликатов, млн	1,9 [1,6; 2,3]	2,0 [1,8; 2,4]	0,065	1,9 [1,7; 2,2]	2,1 [1,9; 2,4]	0,093	2,0 [1,8; 2,4]	2,0 [1,8; 2,3]	0,46
Количество картированных чтений, млн	1,6 [1,1; 1,7]	1,3 [1,2; 1,5]	0,53	1,4 [1,2; 1,7]	1,5 [1,3; 1,6]	0,30	1,5 [1,2; 1,6]	1,4 [1,2; 1,6]	0,50
Количество картированных чтений, попавших в границы генов [†]	0,13 [0,074; 0,23]	0,20 [0,13; 0,26]	0,039	0,14 [0,11; 0,22]	0,21 [0,093; 0,25]	0,46	0,12 [0,089; 0,167]	0,21 [0,17; 0,28]	0,002*
TRM на образец (по генам человека) [§]	0,020 [0,012; 0,044]	0,043 [0,03; 0,090]	0,002*	0,023 [0,012; 0,047]	0,043 [0,027; 0,078]	0,008	0,023 [0,012; 0,043]	0,052 [0,03; 0,12]	0,001*
TRM на образец (по генам микроРНК)	131,3 [87,4; 215,6]	134,0 [74,2; 213,4]	0,32	129,1 [78,8; 202,0]	131,27 [75,7; 214,1]	0,71	78,23 [64,03; 83,8]	213,46 [188,7; 231,9]	<0,001*
Количество экспрессированных микроРНК (не <2 чтений на микроРНК)	141,0 [126,0; 161,3]	151,5 [130,3; 158,5]	0,59	141,0 [126,8; 163,0]	147,0 [127,8; 157,8]	0,82	128,0 [106,0; 140,8]	158,5 [148,8; 165,8]	<0,001*
Количество экспрессированных микроРНК (>50 чтений на микроРНК)	39,5 [32,5; 60,8]	51,0 [39,6; 56,0]	0,42	40,5 [32,5; 62,0]	48,0 [35,2; 54,8]	0,95	36,5 [29,3; 41,3]	54,0 [49,0; 72,5]	<0,001*

Примечание: * — значимость $p < 0,05$ после поправки Холма на множественные сравнения, [†] — рассчитано для генов, на которые картировано хотя бы 2 чтения и как минимум в четверти образцов из выборки, [§] — версия ENCODE v47, микроРНК — малые некодирующие молекулы рибонуклеиновой кислоты, Me [Q25; 75] — медиана [интерквартильный размах], TRM — tags per million reads (теги на млн прочтений), УМИ — unique molecular identifiers (уникальные молекулярные идентификаторы), vs — против.

Таким образом, для каждого типа образца (плазма/сыворотка) было 4 варианта оптимизации (200 мкл/300 мкл; протокол-1нг/протокол-10нг). В каждом варианте оптимизации использовались аликвоты одних и тех же образцов от 4-х человек. При приготовлении библиотек использовалось 5 мкл выделенной РНК, при этом исходное количество микроРНК варьировало от 6 до 21 нг. Дизайн исследования представлен на рисунке 1 и в таблице 1.

Димеры адаптеров

Изначально при работе с набором QIAseq был использован протокол для сыворотки/плазмы и индексы QIAseq miRNA 96 Index Kit IL UDI-A (Qiagen, Германия). При анализе качества и длины

полученных библиотек с помощью капиллярного электрофореза был виден пик, соответствующий димерам адаптеров (178 п.н.). Проверка всех реагентов показала, что использование другого набора индексов — QIAseq miRNA 96 Index Kit IL UDI-B (Qiagen, Германия), привело к значительному уменьшению количества димеров адаптеров. Выявленные различия в работе индексов из разных наборов, отчасти, можно объяснить независимым от нас несоблюдением условий хранения и/или транспортировки наборов компаниями-поставщиками. Пример результатов капиллярного электрофореза для библиотек, приготовленных параллельно из одного и того же образца РНК при использовании ин-

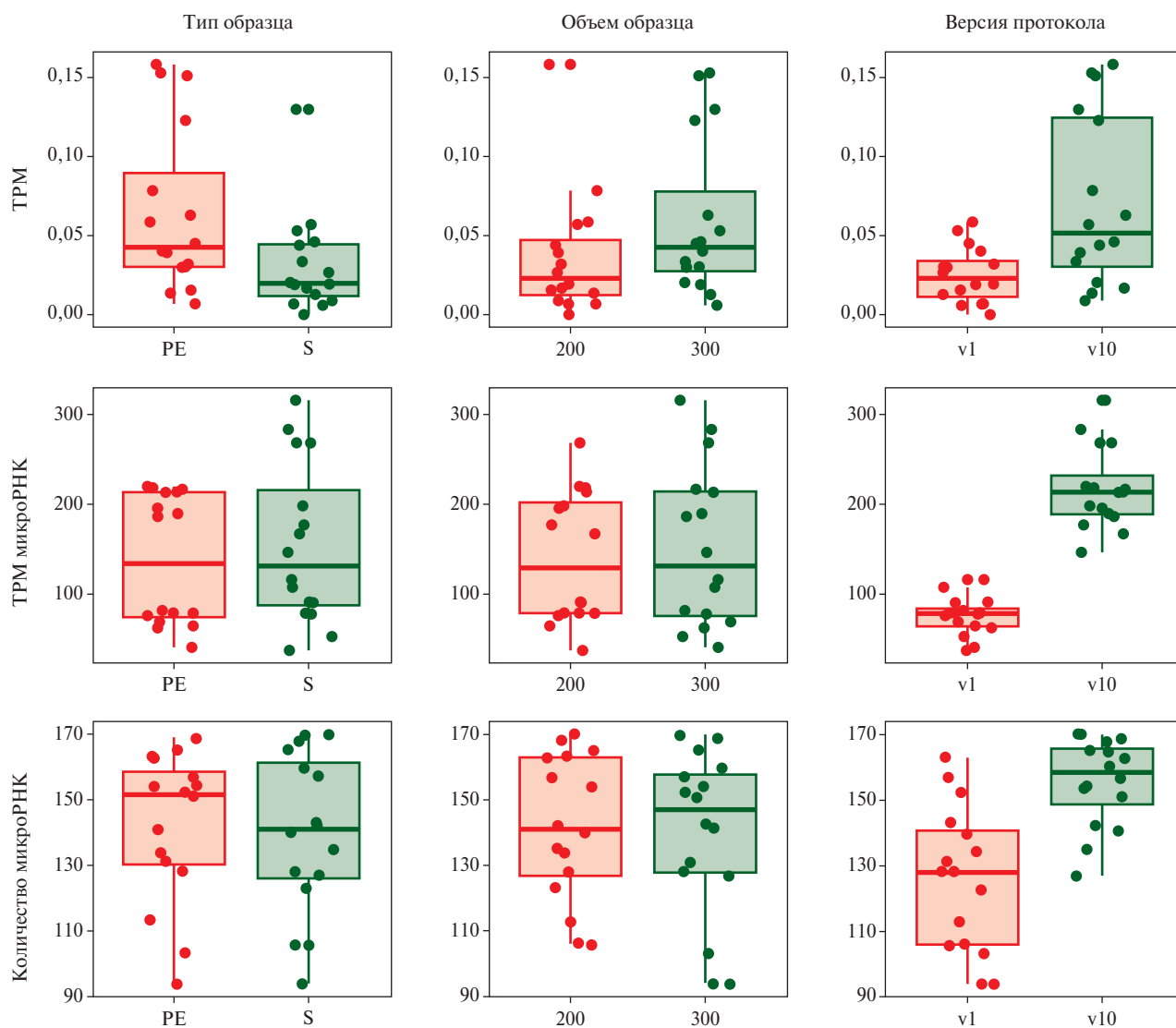


Рис. 3 Распределение медианных значений показателей в группах сравнения; точками представлены медианные значения для каждого из образцов.

Примечание: TPM — TPM на образец (по генам человека), версия ENCODE v47, TPM микроРНК — TPM на образец (по генам микроРНК), количество микроРНК — количество экспрессированных микроРНК (не <2 чтений на микроРНК), "S" — сыворотка, "PE" — плазма с ЭДТА, "200" или "300" — объем исходного биообразца перед выделением РНК, "v1" или "v10" — версия протокола для приготовления библиотек. РНК — рибонуклеиновая кислота, микроРНК — малые некодирующие молекулы РНК, ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота, TPM — tags per million reads (теги на млн прочтений).

дексов из разных наборов, приведен на рисунке 2. Несмотря на уменьшение концентрации димеров адаптеров, у некоторых образцов были выявлены другие пики (185-192 п.н. и 208 п.н.), соответствующие фрагментам РНК и другим малым РНК, включая наиболее крупный класс микроРНК (piРНК, (piwi-interacting), отличные от целевого пика (200 п.н.), что, вероятно, также может приводить к снижению количества чтений, картированных на гены микроРНК [11].

Сравнение разных вариантов оптимизации протокола

Сравнительные характеристики исследуемых групп приведены в таблицах 2 и 3, а также на ри-

сунке 3. Статистически значимых различий между 8 группами (по 4 образца в каждой) получено не было. Это может быть объяснено небольшим размером выборки и использованием рангового теста Вилкоксона, что, на наш взгляд, оправдано в силу сложности распределения исследуемого параметра (таблица 2).

В таблице 3 представлены результаты по группам, объединенным по следующим параметрам (n=16): тип биообразца (плазма/сыворотка); объем биообразца, использовавшийся при выделении РНК (200/300 мкл); протокол приготовления библиотек (протокол-1нг/протокол-10нг). При сравнении групп сыворотки и плазмы статистически

значимо различались показатели концентрации микроРНК после выделения тотальной РНК и количество тегов на млн прочтений (TPM, tags per million reads) на образец по генам человека; при сравнении групп, в которых для выделения РНК были использованы 200 и 300 мкл исходного биообразца (сыворотки или плазмы) — показатели концентрации микроРНК после выделения тотальной РНК; при сравнении групп образцов, приготовленных с использованием разных версий протокола — количество картированных чтений, попавших в границы генов, показатели TPM на образец по генам человека и по генам микроРНК, а также количества экспрессированных микроРНК.

Анализ с помощью метода главных компонент

Для определения однородности полученных данных был использован метод PCA, с помощью которого на основании данных об уровне экспрессии генов микроРНК человека (версия генома ENCODE v47) была показана относительная однородность изучаемых групп (рисунок 4).

Обсуждение

Согласно результатам ряда сравнительных исследований, набор QIAseq miRNA Library Kit обеспечивает высокое качество подготовки библиотек [10, 11, 13-17]. Однако при работе с образцами с низким содержанием микроРНК (плазма или сыворотка крови) или биообразцов с длительным сроком хранения для улучшения показателей секвенирования может потребоваться дополнительная оптимизация протокола [18]. Поиск литературы показал, что было опубликовано два исследования, направленных на оптимизацию протокола приготовления библиотек QIAseq miRNA Library Kit: Rodgers O, et al. (2025) [18] и Hasby F, et al. (2025) [12].

В исследовании Rodgers O, et al. (2025) проводили оптимизацию для образцов плазмы небольшого объема (100 мкл), используемых в педиатрии [18]. В работе было изучено влияние ряда модификаций протокола на выход библиотек: предварительное концентрирование образцов РНК, использование разных разведений адаптеров и праймеров для обратной транскрипции и количества циклов амплификации. Кроме того, были внесены изменения в этапы очистки с использованием магнитных частиц, однако их влияние сравнительной оценке не подвергалось. Наибольшая концентрация библиотек была достигнута при использовании версии протокола производителя для 1 нг РНК (1:20-1:10-1:20-24 цикла), который был выбран авторами для дальнейшего использования. Однако отсутствие данных по показателям секвенирования затрудняет сопоставление их результатов с нашими.

В работе Hasby F, et al. (2025) для 10 нг исходной микроРНК максимальные концентрации библиотек и количество сырых чтений были получе-

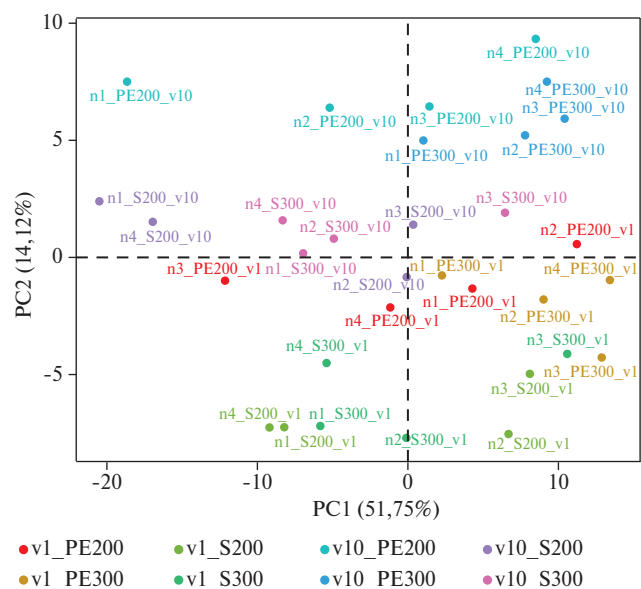


Рис. 4 PCA на основании данных об уровне экспрессии генов микроРНК человека.

Примечание: PC — principal component (главная компонента), суффикс "n" в названии образцов обозначает номер участника, "S" — сыворотку, "PE" — плазму с ЭДТА, "200" или "300" — объем исходного биообразца перед выделением РНК, "v1" или "v10" — версия протокола для приготовления библиотек; РНК — рибонуклеиновая кислота, микроРНК — малые некодирующие молекулы РНК, ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота, PCA — principal component analysis (анализ главных компонент). Цветное изображение доступно в электронной версии журнала.

ны при использовании протокола с наибольшим числом циклов амплификации. В то же время для 1 нг исходной микроРНК, при увеличении числа циклов амплификации и степени разведения адаптеров, возрастала доля димеров адаптеров. Также при увеличении числа циклов амплификации и степени разведения адаптеров как при 10 нг, так и при 1 нг исходной микроРНК, возрастала доля чтений, исключаемых из анализа после дедупликации по UMI и снижалось количество детектируемых микроРНК [12].

В настоящем исследовании сравнение двух версий протокола (протокол-1нг и протокол-10нг) выявило статистически значимые различия для показателей количества картированных чтений, попавших в границы генов, TPM на образец по генам человека и по генам микроРНК, а также по количеству экспрессированных микроРНК. Наилучшие результаты были получены при использовании протокола-10нг, который предусматривал: в 4 раза более высокие концентрации адаптеров и праймеров для обратной транскрипции; на 3 цикла ПЦР меньше. Протокол производителя для 10 нг исходной РНК даже при меньшем фактическом количестве показал более высокие значения TPM, что согласуется с выводами Hasby F, et al. (2025) [12].

В этой же работе [12] показано, что с увеличением исходного количества микроРНК возрастают концентрации получаемых библиотек, снижается доля димеров адаптеров и доля чтений, элиминируемых при дедупликации, а также увеличивается число детектируемых микроРНК. Однако в этом исследовании использовался коммерческий образец тотальной РНК с 10-кратными различиями в количестве (1, 10 и 100 нг).

При работе с образцами с низким содержанием микроРНК одним из возможных подходов к увеличению исходного количества микроРНК может быть концентрирование. Однако данные о его эффективности противоречивы. Так, Rodgers O, et al. (2025) продемонстрировали, что концентрирование РНК увеличивает концентрации получаемых библиотек [18], тогда как Grieco GE, et al. (2021) не наблюдали улучшения показателей при сокращении объема с 18 мкл до 5 мкл. В их работе концентрирование не повлияло на выход библиотек малых РНК, качество секвенирования и распределение типов малых РНК [27]. Кроме того, в работе [18] не было выявлено значимых различий в результатах секвенирования между образцами, полученными из 100 и 200 мкл плазмы.

Согласно рекомендациям производителя используемого нами набора, для выделения РНК miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit (Qiagen, Германия), увеличения выхода РНК можно добиться, увеличив объем плазмы или сыворотки. Однако отмечается, что увеличение объема образца нежела-

тельно в связи с тем, что увеличение количества контаминантов может повлиять на процесс очистки.

Полученные нами результаты показали, что увеличение объема биообразцов при выделении РНК, хотя и привело к повышению концентрации выделенной микроРНК, а после секвенирования — к повышению числа ТРМ на образец по генам человека, в то же время не оказало влияния на значение показателя ТРМ на образец при анализе генов микроРНК.

Кроме того, поскольку в нашем исследовании использовались парные образцы сыворотки и плазмы крови от одних и тех же доноров, было возможно сравнить их характеристики. В результате количество РНК после выделения было выше для сыворотки, однако количество чтений и ТРМ на образец было выше для плазмы крови.

Заключение

Оптимизация существующих протоколов подготовки библиотек для биообразцов с низким содержанием микроРНК может значительно улучшить показатели секвенирования. В настоящем исследовании ключевым фактором, обеспечившим повышение эффективности, стало сокращение числа циклов ПЦР.

Отношения и деятельность. Государственное задание "Свободно циркулирующие микроРНК плазмы крови как диагностические и прогностические биомаркеры ИБС".

Литература/References

- Matias-Garcia PR, Wilson R, Mussack V, et al. Impact of long-term storage and freeze-thawing on eight circulating microRNAs in plasma samples. *PLoS One*. 2020;15:e0227648. doi:10.1371/journal.pone.0227648.
- O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, et al. Overview of MicroRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:402. doi:10.3389/fendo.2018.00402.
- Mikhailina VI, Meshkov AN, Kiseleva AN, et al. MicroRNA as biomarkers of coronary artery disease in real-world practice. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2024;23(12):4225. (In Russ.) Михайлина В. И., Мешков А. Н., Киселева А. В. и др. МикроРНК как биомаркеры ишемической болезни сердца для использования в клинической практике. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2024;23(12):4225. doi:10.15829/1728-8800-2024-4225.
- Kiseleva AV, Sotnikova EA, Kutsenko VA, et al. Circulating microRNAs and collateral circulation in coronary chronic total occlusion. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2024;23(10):4190. (In Russ.) Киселева А. В., Сотникова Е. А., Куценко В. А. и др. Циркулирующие микроРНК и развитие коллатерального кровообращения при хронической окклюзии коронарной артерии. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2024;23(10):4190. doi:10.15829/1728-8800-2024-4190.
- Wang J, Chen J, Sen S. MicroRNA as biomarkers and diagnostics. *J Cell Physiol*. 2016;231:25-30. doi:10.1002/jcp.25056.
- Chan S-F, Cheng H, Goh KK-R, et al. Preanalytic Methodological Considerations and Sample Quality Control of Circulating miRNAs. *J Mol Diagn*. 2023;25:438-53. doi:10.1016/j.jmoldx.2023.03.005.
- Sotnikova EA, Kiseleva AV, Meshkov AN. Effect of plasma and serum storage conditions on circulating microRNA levels. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2024;23(11):4180. (In Russ.) Сотникова Е. А., Киселева А. В., Мешков А. Н. Влияние условий хранения плазмы и сыворотки на уровни циркулирующих микроРНК. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2024;23(11):4180. doi:10.15829/1728-8800-2024-4180.
- Sotnikova EA, Kiseleva AV, Meshkov AN. Preanalytical factors affecting the plasma and serum levels of circulating microRNAs. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2024;23(11):4179. (In Russ.) Сотникова Е. А., Киселева А. В., Мешков А. Н. Факторы преаналитического этапа, влияющие на уровни циркулирующих микроРНК плазмы и сыворотки крови. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2024;23(11):4179. doi:10.15829/1728-8800-2024-4179.
- Suzuki K, Yamaguchi T, Kohda M, et al. Establishment of preanalytical conditions for microRNA profile analysis of clinical plasma samples. *PLoS One*. 2022;17:e0278927. doi:10.1371/journal.pone.0278927.
- Androvic P, Benesova S, Rohlova E, et al. Small RNA-sequencing for analysis of circulating miRNAs: benchmark study. *J Mol Diagn*. 2022;24:386-94. doi:10.1016/j.jmoldx.2021.12.006.
- Coenen-Stass AML, Magen I, Brooks T, et al. Evaluation of methodologies for microRNA biomarker detection by next generation

- sequencing. *RNA Biol.* 2018;15:1133-45. doi:10.1080/15476286.2018.1514236.
12. Hasby F, Bachmann J, Wang C, et al. Adapter dilution and input optimization for Qiagen QIAseq miRNA Library kit. *bioRxiv.* 2025. doi:10.1101/2025.04.30.651388.
 13. Benesova S, Kubista M, Valihrach L. Small RNA-sequencing: Approaches and considerations for miRNA analysis. *Diagnostics (Basel).* 2021;11:964. doi:10.3390/diagnostics11060964.
 14. Barberán-Soler S, Vo JM, Hogans RE, et al. Decreasing miRNA sequencing bias using a single adapter and circularization approach. *Genome Biol.* 2018;19:105. doi:10.1186/s13059-018-1488-z.
 15. Herbert ZT, Thimmapuram J, Xie S, et al. Multisite evaluation of next-generation methods for small RNA quantification. *J Biomol Tech.* 2020;31:47-56. doi:10.7171/jbt.20-3102-001.
 16. Wong RKY, MacMahon M, Woodside JV, et al. A comparison of RNA extraction and sequencing protocols for detection of small RNAs in plasma. *BMC Genomics.* 2019;20:446. doi:10.1186/s12864-019-5826-7.
 17. Heinicke F, Zhong X, Zucknick M, et al. Systematic assessment of commercially available low-input miRNA library preparation kits. *RNA Biol.* 2020;17:75-86. doi:10.1080/15476286.2019.1667741.
 18. Rodgers O, Watson CJ, Waterfield T. MiRNA library preparation optimisation for low-concentration and low-volume paediatric plasma samples. *Noncoding RNA.* 2025;11. doi:10.3390/ncrna11010011.
 19. Kopylova OV, Ershova AI, Pokrovskaya MS, et al. Population-nosological research biobank of the National Medical Research Center for Therapy and Preventive Medicine: analysis of bio-samples, principles of collecting and storing information. *Cardiovascular Therapy and Prevention.* 2022;20(8):3119. (In Russ.)
 20. Копылова О. В., Ершова А. И., Покровская М. С. и др. Популяционно-нозологический исследовательский биобанк "НМИЦ ТПМ": анализ коллекций биообразцов, принципы сбора и хранения информации. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика.* 2022;20(8):3119. doi:10.15829/1728-8800-2021-3119.
 20. Smith T, Heger A, Sudbery I. UMI-tools: modeling sequencing errors in Unique Molecular Identifiers to improve quantification accuracy. *Genome Res.* 2017;27:491-9. doi:10.1101/gr.209601.116.
 21. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet J.* 2011;17:10. doi:10.14806/ej.17.1.200.
 22. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics.* 2013;29:15-21. doi:10.1093/bioinformatics/bts635.
 23. Danecek P, Bonfield JK, Liddle J, et al. Twelve years of SAMtools and BCFtools. *GigaScience.* 2021;10:giab008. doi:10.1093/gigascience/giab008.
 24. Liao Y, Smyth GK, Shi W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics.* 2014;30:923-30. doi:10.1093/bioinformatics/btt656.
 25. ENCODE Project Consortium. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature.* 2012;489:57-74. doi:10.1038/nature11247.
 26. Wickham H. *Ggplot2: Elegant graphics for data analysis.* New York, NY: Springer; 2009. ISBN: 978-0-387-98141-3.
 27. Grieco GE, Sebastiani G, Fignani D, et al. Protocol to analyze circulating small non-coding RNAs by high-throughput RNA sequencing from human plasma samples. *STAR Protoc.* 2021;2:100606. doi:10.1016/j.xpro.2021.100606.