



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **102400** (13) **U**  
(51) МПК (2015.01)  
**G01N 21/00**

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2015 04559**  
(22) Дата подання заявки: **12.05.2015**  
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: **26.10.2015**  
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **26.10.2015, Бюл.№ 20**

(72) Винахідник(и):  
**Камишний Олександр Михайлович (UA),  
Жеребятьєв Олександр Сергійович (UA),  
Топол Інна Олександрівна (UA),  
Деген Анна Сергіївна (UA),  
Тарасевич Юлія В'ячеславівна (UA),  
Прозорова Тетяна Михайлівна (UA),  
Путілін Денис Анатолійович (UA),  
Камишна Віта Анатоліївна (UA)**

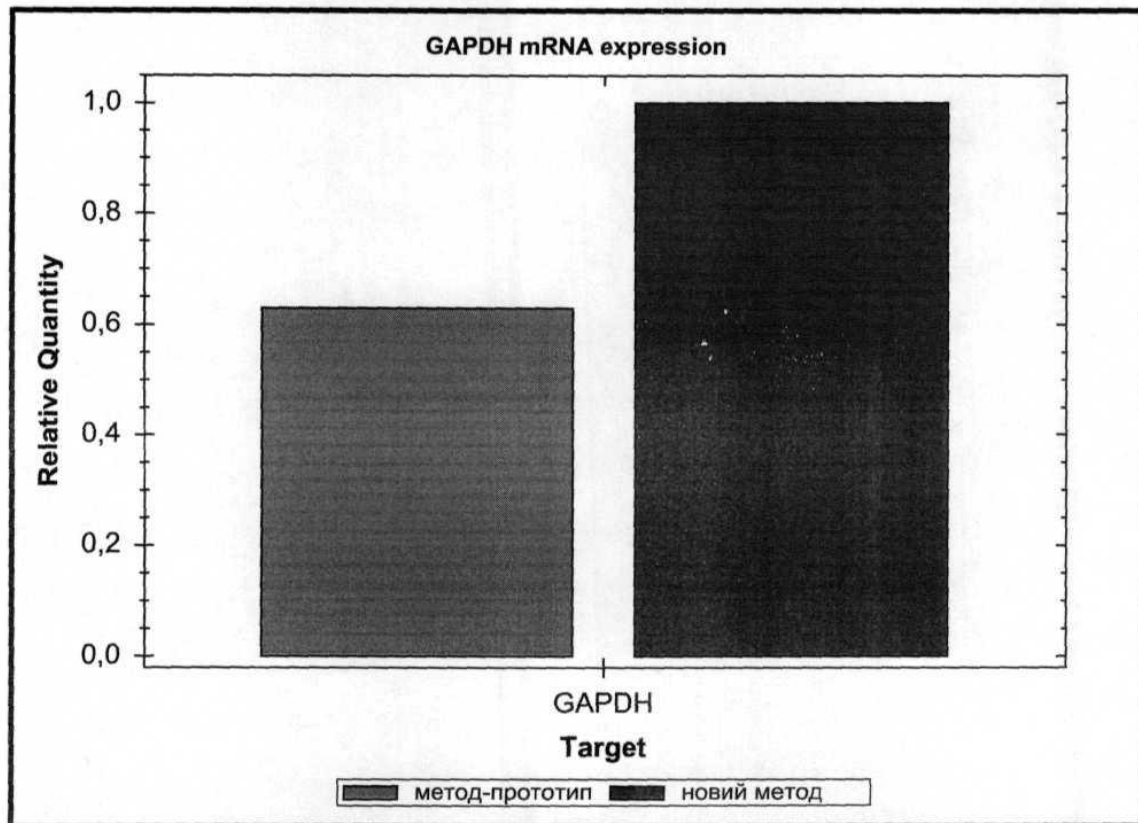
(73) Власник(и):  
**ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ  
УНІВЕРСИТЕТ,  
пр. Маяковського, 26, м. Запоріжжя, 69035 (UA),  
Камишний Олександр Михайлович,  
вул. Мала, 3, кв. 204, м. Запоріжжя, 69026 (UA),  
Жеребятьєв Олександр Сергійович,  
пр. Маяковського, 24-а, кв. 187, м. Запоріжжя, 69000 (UA),  
Топол Інна Олександрівна,  
вул. Паторжинського, 2-в, м. Запоріжжя, 69081 (UA),  
Деген Анна Сергіївна,  
вул. Зернова, 30-а, кв. 18, м. Запоріжжя, 69121 (UA),  
Тарасевич Юлія В'ячеславівна,  
вул. Ентузіастів, 19-а, кв. 47, м. Запоріжжя, 69097 (UA),  
Прозорова Тетяна Михайлівна,  
вул. Дудикіна, 9-а, кв. 28, м. Запоріжжя, 69065 (UA),  
Путілін Денис Анатолійович,  
вул. Грязнова, 81, кв. 23, м. Запоріжжя, 69002 (UA),  
Камишна Віта Анатоліївна,  
вул. Мала, 3, кв. 204, м. Запоріжжя, 69026 (UA)**

## (54) СПОСІБ ВИДІЛЕННЯ РНК З ФІКСОВАНИХ В РІДИНІ БУЕНА ТА ЗАЛИТИХ В ПАРАФІНОВІ БЛОКИ ЗРАЗКІВ ТКАНИН

### (57) Реферат:

Спосіб виділення РНК з фіксованих в рідині Буена та залитих в парафінові блоки зразків тканин шляхом проведення депарафінізації зразка тканини з використанням ксилолу, гідратації шляхом послідовної промивки розчинами нижчих спиртів з концентрацією, що знижується, гомогенізації, виділення тотальної РНК, проведення зворотної транскрипції та полімеразно-ланцюгової реакції у реальному часі. Гомогенізацію парафінізованої тканини проводять перед депарафінізацією, при цьому гомогенізують весь зразок тканини з використанням ксилолу.

UA 102400 U



Корисна модель належить до медицини, а саме біотехнології та молекулярної біології, і може бути використана для виділення рибонуклеїнових кислот (РНК) з біологічного та клінічного матеріалу та подальших молекулярно-біологічних досліджень.

Архівні тканини - найбільш поширений матеріал для ретроспективних клінічних досліджень.

Ці тканини часто використовуються для визначення експресії генів як прогностичних або терапевтичних цільових показників. Методика, яка широко використовується для архівації зразків матеріалу лімфоїдних органів, це фіксація в рідині Буена та подальша заливка в парафінові блоки (formalin-fixed, paraffin-embedded-FFPE). Оскільки залиті у парафін зразки мають широке застосування, то існує необхідність у швидких та надійних методах виділення нуклеїнових кислот, а зокрема РНК, із зазначених зразків.

Існують деякі способи екстракції РНК з біологічних зразків, однак, жоден з них не є достатньо надійним для виділення з FFPE-зразків. Так, наприклад, Chomczynski [Patent US 5346994A] описує метод виділення РНК з тканин на основі рідиннофазного поділу з використанням фенолу і гуанідинізоціанату. Біологічний зразок гомогенізують у водному розчині фенолу і гуанідинізоціанату, а потім гомогенат змішують з хлороформом. Після центрифугування гомогенат поділяють на органічну фазу, інтерфазу і водну фазу.

Білкі зосереджуються в органічній фазі, ДНК в інтерфазі, а РНК у водній фазі. РНК може осідати з водної фази. Цей метод не дозволяє здійснювати надійне виділення РНК з FFPE-зразків. В інших методах зазвичай використовують екстракцію або солями гуанідину, або фенолом, як описано, наприклад, Sambrook J. et al. (1989), pp. 7.3-7.24 і Ausubel F.M. et al. (1994), pp. 403-447. Проте недоліком цих відомих методів є низький вихід цільового продукту і неможливість виділення низькомолекулярних фракцій РНК з FFPE-зразків.

Найбільш близьким за технічною суттю та результатом, що досягається, є спосіб, який полягає спочатку у депарафінізації тонких зрізів парафінованого зразка органічним розчинником, переважно ксилолом. Після цього зразки піддають повторній гідратації шляхом послідовної промивки розчинами нижчих спиртів з концентрацією, що знижується, і гомогенізують механічним, ультразвуковим або яким-небудь іншим методом. Після цього проводять виділення тотальної РНК, проведення зворотної транскрипції і проведення полімеразно-ланцюгової реакції у реальному часі (Євразійський патент 008832, заявка №200501772, дата публікації і видачі патента 2007. 08. 31. Int. cl. C12Q1/68. Способи измерения экспрессии генов из фиксированного и залитого в парафин образца ткани).

Спільними суттєвими ознаками найближчого аналога та корисної моделі, що заявляється, є такі:

- Депарафінізація зразка тканини з використанням ксилолу.
- Гідратація шляхом послідовної промивки розчинами нижчих спиртів з концентрацією, що знижується.
- Гомогенізація.
- Виділення тотальної РНК.
- Проведення зворотної транскрипції.
- Проведення полімеразно-ланцюгової реакції у реальному часі.

Цей спосіб є недостатньо ефективним тому, що в деяких випадках, коли кількість матеріалу мала, має місце часткова втрата РНК, що може в подальшому, наприклад в полімеразно-ланцюговій реакції із зворотною транскрипцією в реальному часі, привести до хибно негативного результату. Також потрібно використовувати дороге оснащення для виготовлення тонких зрізів тканини і витратити багато часу для їх приготування.

В основу корисної моделі поставлено задачу удосконалення способу виділення РНК з фіксованих в рідині Буена та залитих в парафінові блоки зразків тканин шляхом зміни послідовності етапів та використання всього представленого біологічного зразка, що дозволить підвищити ефективність специфічного виділення цільового продукту, знизити матеріальні затрати та час проведення дослідження.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі, який включає проведення депарафінізації зразка тканини з використанням ксилолу, гідратації шляхом послідовної промивки розчинами нижчих спиртів з концентрацією, що знижується, гомогенізації, наступного виділення тотальної РНК, проведення зворотної транскрипції та полімеразно-ланцюгової реакції у реальному часі новим є те, що гомогенізацію парафінізованої тканини проводять перед депарафінізацією, при цьому гомогенізують весь зразок тканини з використанням ксилолу.

Причинно-наслідковий зв'язок між сукупністю ознак, що заявляються, та технічним результатом полягає у такому.

Гомогенізацію парафінізованої тканини проводять перед депарафінізацією і при цьому гомогенізують весь зразок тканини. По-перше, це дозволить зменшити втрати РНК при

обробленні зразків. По-друге, до переваг запропонованого нами методу потрібно віднести те, що не потрібно робити тонкі зрізи зразків, використовуючи при цьому дороге оснащення. Насамперед це дозволяє значно економити час для їх приготування і робить можливим значно здешевити весь процес. Також ефективність запропонованого способу, підтверджується даними експериментального дослідження, яке показало, що, запропонований спосіб виділення РНК із зразків біологічних тканин фіксованих в рідині Буена та в подальшому залитих в парафінові блоки покращує якість специфічного виділення цільового продукту (РНК) та запобігає її втраті під час обробки зразку.

Таким чином, запропонований спосіб дозволяє одержати високий вихід цільового продукту (РНК) з FFPE-зразків.

Спосіб здійснюють таким чином.

1. Депарафінізація зразків, попередньо фіксованих в розчині Буена і залитих в парафін.

1.1 Проводять гомогенізацію зразка видаленого з парафінового блоку з 1 мл 100 % ксилолу. Переносять гомогенат в пробірку і інкубують протягом 5-ти хв. Перемішують на вортексі і короткочасно (протягом 1 хв.) центрифугують для осадження тканини. Видаляють ксилол, не порушуючи осаду.

1.2 Додають 1 мл 100 % ксилолу і інкубують протягом 5-ти хв. Перемішують на вортексі і нагрівають зразок протягом 3 хв. при 50 °С, щоб розплавити парафін. Центрифугують зразок протягом 2 хв. при кімнатній температурі при максимальній швидкості для осадження тканини. Видаляють ксилол, не порушуючи осаду. Якщо осад нещільний, залишають деяку кількість ксилолу в пробірці, щоб уникнути видалення шматочків тканини.

1.3 Додають 1 мл 100 % етанолу на зразок протягом 5 хв., і перемішують на вортексі. Центрифугують 2 хв. при максимальній швидкості для осадження тканини. Етанол буде містити слідові кількості ксилолу і, відповідно, його необхідно акуратно видалити, не порушуючи, осаду.

1.4 Додавали 1 мл 96 % етанолу на зразок і інкубували протягом 5 хв., перемішували на вортексі. Центрифугували зразок впродовж 2 хв. при максимальній швидкості (14000-16000 об/хв.) для осадження тканини. Акуратно видаляли супернатант, не порушуючи, осаду.

1.5 Додавали 1 мл 70 % етанолу на зразок і інкубували протягом 5 хв., перемішували на вортексі. Центрифугували зразок протягом 1-2 хв. при максимальній швидкості (14000-16000 об/хв.) для осадження тканини. Акуратно видаляли супернатант, не порушуючи осаду. Висушували на повітрі осад протягом 15-30 хв. для видалення залишку етанолу.

2. Виділення тотальної РНК.

Виділення тотальної РНК з тканини щурів проводили з використанням набору „Trizol RNA Prep 100” виробництва Росії, який містить Trizol reagent (лізуючий реагент, до складу якого входить денатуруючий агент гуанідинтіоціонат та фенол с pH = 4.0) та ExtraGene E (суспензія суміші іонообмінників).

РНК виділяли відповідно протоколу до набору для виділення з виконанням наступних етапів:

2.1 В пробірці загальним об'ємом 1,5 мл вносять по 100 мкл подрібненої тканини, що досліджується, додають 1 мл Trizol reagent та інтенсивно перемішують вміст до утворення гомогенної емульсії. Інкубують пробірки при 4 °С протягом 5 хв.

2.2 Додають в пробірки 200 мкл хлороформу та інтенсивно перемішують вміст пробірок. Пробірки інкубують при 4 °С протягом 5 хв.

2.3 Центрифугують („СМ-50”, Латвія) пробірки з сумішшю 5 хвилин при 14000 об/хв... для розділення фаз. Прозору верхню фазу з РНК обережно переносять в стерильну пробірку загальним об'ємом 1,5 мл, намагаючись не задіти пограничну між фазами білу плівку з ДНК та білками.

2.4 Додають в пробірки рівний об'єм ізопропанолу, приблизно 600 мкл.

2.5 Інтенсивно перемішують вміст пробірок та переносять пробірки в морозильну камеру („LG”, Корея) при -20 °С на 30 хв.

2.6 Центрифугують пробірки з сумішшю 15 хвилин при 14000 об/хв. Повністю видаляють супернатант перевертанням пробірки. Видалення супернатанту відсасуванням пов'язано з ризиком втратити осад РНК.

2.7 Додають в пробірку 1 мл холодного 75 % етилового спирту, перемішують вміст пробірки перевертанням 4-5 разів, центрифугують пробірки з сумішшю 5 хв при 14000 об/хв та обережно видаляють супернатант перевертанням пробірки.

2.8 Просушують осад при температурі 65 °С протягом 3 хв.

2.9 Додають в пробірки 50-100 мкл реагенту ExtraGene E (ExtraGene E слід відбирати від загального об'єму при постійному перемішуванні).

2.10 Суспендують вміст на вортексі 15-20 с та залишають при кімнатній температурі на 15-20 хв. Потім ще раз суспендують вміст пробірок на вортексі.

Концентрацію та якість виділеної тотальної РНК визначали на спектрофотометрі Libra S32PC (Biochrom Ltd., Англія). Для подальшої процедури зворотної транскрипції відбирали зразки РНК з наступними показниками (за співвідношенням оптичної щільності A260/A280): 260 нм/280нм=2, 260нм/230нм= 1,8-2,2.

#### 5 3. Зворотна транскрипція (виділення кДНК)

Для зворотної транскрипції (синтез кДНК) використовували „ Набор реагентів для проведення обратной транскрипции (ОТ) ” („ СИНТОЛ ”, Москва). Транскрипційну суміш готували відповідно до наступного протоколу:

10 3.1 Готують наступну реакційну суміш в пробірці на льоду: тотальна РНК (2 мкл) - 5 мкл; Random-6 праймера (1 мкл); деіонізована вода, очищена від нуклеаз - 11 мкл. Загальний об'єм - 14 мкл. Обережно перемішують.

3.2 В пробірку додають наступні компоненти в зазначеному порядку: реакційна суміш (2,5х) - 10 мкл; зворотна транскриптаза MMLV-RT-1 мкл. Загальний об'єм - 25 мкл. Обережно перемішують и центрифугують.

15 3.4 Інкують суміш при 45 °С протягом 45 хв.

Зупиняли реакцію прогріванням при 92 °С протягом 5 хв. Переносили пробірки на лід.

4. Полімеразно-ланцюгова реакція у реальному часі.

Для визначення рівня експресії досліджуваних генів проводили ОТ-ПЛР в реальному часі з використанням Maxima TM SYBR Green/ROXq PCR MasterMix (2x) (Thermo Scientific) на ампліфікаторі CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems (Bio-Rad, США) за таких умов: початкова денатурація починалася з попередньої активації ДНК-полімерази протягом 10 хв. при 95 °С та складалася з 50 циклів: денатурація - 95 °С, 15 сек., віджиг праймерів - 55 °С -64 °С, 30 сек., елонгація - 72 °С, 30 сек. Реєстрація інтенсивності флуоресценції SybrGreen відбувалася автоматично наприкінці стадії елонгації кожного циклу при 72 °С по каналу SybrGreen.

25 Для приготування однієї проби використовували 25 мкл реакційної суміші, при цьому додавали наступні компоненти на одну пробірку при кімнатній температурі: 2-кратний Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2x) - 12,5 мкл; суміш праймерів (прямий і зворотний) по 0,3 мкМ кожного, додавали кДНК (≤500 нг / реакція). Об'єм доводили до 25 мкл деіонізованою водою.

30 Специфічні пари праймерів для аналізу досліджуваних генів були розроблені за допомогою програмного забезпечення Primer-BLAST (NIH, США) і були виготовлені фірмою Metabion (Німеччина), мали наступну послідовність і температуру віджигу: GAPDH прямий: 5'-GCCTGGAGAAACCTGCCAAG-3' (61,3 °С), GAPDH зворотний: 5'-GCCTGCTTCACCACCTTCT-3' (60,0 °С). Статистичний аналіз даних ПЛР проводили за допомогою програмного забезпечення CFX Manager™.

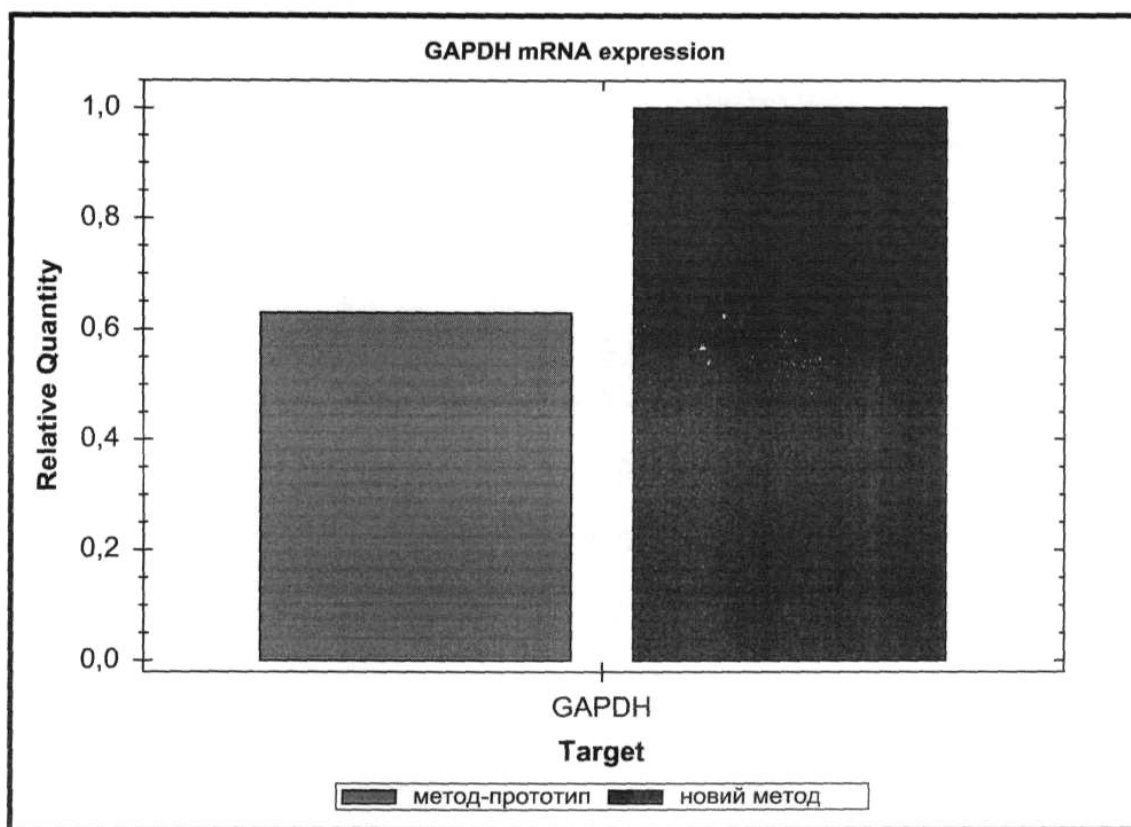
#### 35 Приклад

У цьому прикладі проілюстровано, що гомогенізація парафінізованої тканини з органічним розчинником - ксилолом, а потім проведення гідратації гомогенізованої тканини послідовною промивкою розчинами нижчих спиртів з концентрацією, що знижується, має важливе значення для отримання високого виходу РНК. Для цього проводили ЗТ-ПЛР-експеримент із здійсненням детекції експресії гена GAPDH як міри відносних кількостей виділеної РНК методом-прототипом та новим методом. РРРЕ-зразки ділянок клубової кишки щурів, фіксованої за Буеном, обробляли вищевказаними способами. Виділення тотальної РНК, проведення зворотної транскрипції (виділення кДНК), ампліфікацію та реєстрацію результатів проводили згідно з вищевказаним способом. Рівні РНК визначали за допомогою ЗТ-ПЛР і за допомогою ПЛР-детекції GAPDH в режимі реального часу. Депарафінізація зразків запропонованим нами методом має важливе значення для отримання високого виходу РНК. На кресленні показано порівняння значень рівнів експресії гена, визначеного у РРРЕ-тканині, взятій з одного і того ж джерела, методом-прототипом і новим методом.

50 Таким чином, використаний нами спосіб дозволяє отримати більш високий вихід РНК.

### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

55 Спосіб виділення РНК з фіксованих в рідині Буена та залитих в парафінові блоки зразків тканин шляхом проведення депарафінізації зразка тканини з використанням ксилолу, гідратації шляхом послідовної промивки розчинами нижчих спиртів з концентрацією, що знижується, гомогенізації, виділення тотальної РНК, проведення зворотної транскрипції та полімеразно-ланцюгової реакції у реальному часі, який **відрізняється** тим, що гомогенізацію парафінізованої тканини проводять перед депарафінізацією, при цьому гомогенізують весь зразок тканини з використанням ксилолу.




---

Комп'ютерна верстка І. Скворцова

---

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

---

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601