



УДК 57.088.3

МЕТОДИКА ДЛЯ СТАБИЛЬНОГО ВЫДЕЛЕНИЯ ДВУЦЕПОЧЕЧНОЙ РНК ИЗ ШТАММА *Escherichia coli* HT115 БЕЗ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ФЕНОЛА

© 2025 г. А. А. Иванов*, **, #, Т. С. Голубева*, ***

* Институт цитологии и генетики СО РАН,

Россия, 630090 Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 10

** Новосибирский государственный университет, Россия, 630090 Новосибирск, ул. Пирогова, 2

*** Балтийский федеральный университет им. Иммануила Канта,

Россия, 236041 Калининград, ул. Александра Невского, 14

Поступила в редакцию 07.12.2024 г.

После доработки 17.12.2024 г.

Принята к публикации 18.12.2024 г.

Получение фракции двуцепочечной РНК – неотъемлемая часть исследований РНК-интерференции, направленных на решение как фундаментальных, так и прикладных задач. Наработка дцРНК в культуре бактерий – распространенная методика в силу сравнительно невысокой стоимости и потенциала для масштабирования. В данной статье мы предлагаем новый метод для быстрого и эффективного выделения дцРНК из культуры бактерий в качестве альтернативы классической фенол-хлороформной экстракции. В разработанной нами методике фенол заменен на менее токсичный метанол, а выделенная таким образом бактериальная тотальная РНК содержит до 25% целевой молекулы, при этом примесь ДНК в ней отсутствует, что в том числе делает допустимым применение такой дцРНК без дополнительных этапов очистки. Применение разработанной методики будет оправдано в лабораториях, занимающихся как фундаментальными, так и прикладными исследованиями РНК-интерференции. Однако для масштабирования технологии для применения в сельском хозяйстве могут потребоваться корректировки описанного в данной работе протокола.

Ключевые слова: двуцепочечная РНК, выделение РНК, наработка дцРНК в бактериях, РНК-интерференция, спрей-индуцированный сайленсинг генов

DOI: 10.31857/S0132342325040158, **EDN:** LOLZTF

ВВЕДЕНИЕ

РНК-интерференция встречается в той или иной форме практически у всех эукариот и имеет широкий спектр функций: сайленсинг генов на уровне трансляции, транскрипции, передача сигналов, регуляция активности транспозонов, супрессия иммунитета хозяина при заражении и многое другое [1]. Подавление экспрессии генов на уровне трансляции с помощью РНК-интерференции – это мощный инструмент как для фундаментальных исследований, так и для практических разработок. Механизм посттранскрипционного сайленсинга генов включает раз-

резание двуцепочечной РНК эндонуклеазой Dicer на короткие дуплексы ~20 п.н., после чего одна из цепей дуплекса связывается с белком Argonaute, принимая участие в формировании RISC (RNA-induced silencing complex), который при встрече комплементарной мРНК приводит к ее деградации или остановке трансляции [2].

Одно из перспективных направлений применения РНК-интерференции – использование препаратов двуцепочечной РНК (дцРНК) для защиты сельскохозяйственных растений от вредителей, таких как насекомые [3], грибы [4] и грибоподобные организмы [5], а также от вирусов [6]. Преимущества использования экзогенной РНК

Сокращения: дцРНК – двуцепочечная РНК.

Автор для связи: (тел.: +7 (995) 499-25-94; эл. почта: a.ivanov2@g.nsu.ru).

заключаются в высокой специфичности, отсутствии отрицательных последствий для окружающей среды и человека, а также возможности быстрой смены мишени в случае адаптации патогена [7]. Выбор генов-мишеней для сайленсинга также более широк, чем в случае химических пестицидов.

На фоне активного изучения потенциала так называемого спрей-индуцированного сайленсинга генов (SIGS) для борьбы с патогенами растений открытым остается вопрос о предпочтительных методах получения дцРНК. В лаборатории исследователи часто применяют транскрипцию *in vitro* для получения дцРНК – метод, позволяющий эффективно нарабатывать только целевую молекулу, но слишком дорогой даже для полевых испытаний, не говоря об использовании в сельском хозяйстве [6, 8, 9]. Альтернативное направление – наработка дцРНК в бактериях с последующей фенол-хлороформной экстракцией [10] или применение непосредственно грубого лизата [11]. Недостатки такого подхода – сложность в оценке количества именно дцРНК в грубом лизате, устранимая только после трудоемкой двухкратной очистки с использованием фенола. Подбор недорогой методики очистки, позволяющей выделить из бактерий целевую дцРНК с минимальными примесями, – необходимый шаг на пути к воспроизводимым результатам и масштабированию исследований. Поэтому в данной работе была поставлена цель разработать методику без использования фенола для очистки дцРНК, наработанной в штамме *E. coli* HT115, нокаутном по гену РНКазы III.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка методики выделения дцРНК из бактерий. В основе предлагаемой методики лежит температурное разрушение бактериальных клеток с последующим осаждением белков в интерфазу смеси метанол–хлороформ и дальнейшее осаждение РНК в полиэтиленгликоле (ПЭГ).

В работе для демонстрации возможностей методики использовали несколько ранее полу-

ченных штаммов *Escherichia coli* HT115, трансформированных вектором L4440, несущим фрагменты генов *Phytophthora infestans – inf1* или *inf4* – между поздними промоторами фага T7, а также вектором без вставки. Данная методика позволяет получать стабильный выход целевой дцРНК без примесей ДНК, белков и низкомолекулярных фрагментов нуклеиновых кислот, однако выход может быть снижен для коротких (<200 п.н.) молекул. Полученная таким образом дцРНК может быть использована сразу или подвергнута дальнейшей очистке от примесей нецелевой РНК в зависимости от дизайна эксперимента.

Предлагаемая последовательность выделения РНК из культуры бактерий (подробный протокол приведен в разделе “Эксперим. часть”): 1) разрушение клеток бактерий нагревом до 95°C; 2) обработка ДНКазой; 3) осаждение белков в интерфазу смеси метанол–хлороформ; 4) добавление ПЭГ-8000 и NaCl к водной фазе, инкубация при 4°C; 5) центрифugирование и удаление верхней фазы; 6) отмыкация этанолом, сушка, растворение в mQ H₂O.

Проверка предлагаемой методики. Для проверки работоспособности предлагаемой методики была проведена серия выделений дцРНК из *E. coli* HT115, трансформированных плазмидой L4440 со вставкой, комплементарной мРНК целевого гена *P. infestans*, или без вставки. Усредненные концентрации выделенной РНК, выход и соотношение поглощения света на длинах волн 260/280 и 260/230 нм представлены в табл. 1. Соотношение $A_{260}/A_{280} > 2.0$ говорит в пользу преобладания в образце РНК.

Всего на этом этапе было проведено по два независимых выделения из трех различных культур для каждой плазмиды, суммарно по шесть образцов. Графическое изображение результатов представлено на рис. 1. Можно отметить, что соотношение поглощения света на длинах волн 260, 280 и 230 нм, а также концентрации не претерпевают значительных отклонений в серии выделений.

Таблица 1. Результаты спектрофотометрического измерения параметров образцов выделенной из бактерий РНК

Длина целевой молекулы, п.н.	Выход РНК, мкг/мл культуры	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
180	0.27 ± 0.09	1.97 ± 0.04	2.39 ± 0.02
568	1.44 ± 0.59	2.03 ± 0.02	2.32 ± 0.01
629	1.59 ± 0.60	2.05 ± 0.04	2.28 ± 0.03

Примечание: указаны средние значения для шести независимо выделенных образцов \pm стандартное отклонение.

Необходимо заметить, что выход короткой молекулы, комплементарной полилинкеру плазмида L4440, был значительно ниже, чем у длинных молекул дцРНК. Данную проблему не удалось решить путем повышения концентрации ПЭГ-8000 до 10%, т.к. это приводило к появлению низкомолекулярных примесей. Можно сделать вывод, что данная методика мало подходит для наработки коротких фрагментов дцРНК.

Для того чтобы удостовериться в наличии целевого фрагмента, аликвоту каждой выделенной фракции РНК разводили до концентрации 80 нг/мкл, и присутствие целевой молекулы проверяли с помощью гель-электрофореза в агарозном геле (рис. 2).

Для сравнения на гель были нанесены порции лизата (дорожки 1, 4, 7), полученные из той же культуры, что и РНК в дорожках 2–3, 5–6 и 8–9.

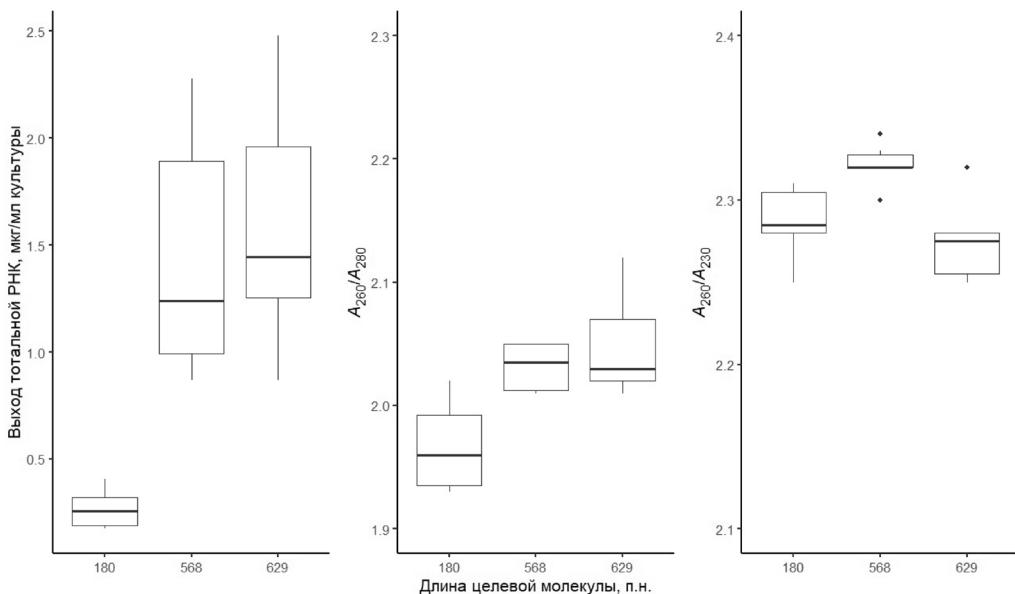


Рис. 1. Результаты измерения оптического поглощения очищенных образцов на длинах волн 230, 260 и 280 нм. Жирная горизонтальная линия соответствует медианному значению. Для каждой из трех целевых молекул проведено по шесть независимых выделений РНК.

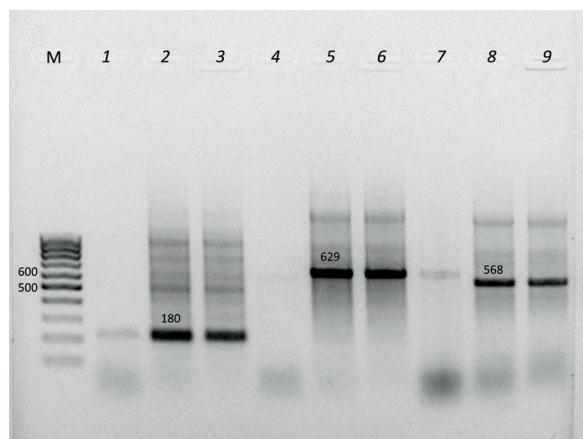


Рис. 2. Электрофоретический анализ дцРНК, выделенной из *E. coli* по предлагаемой методике, в 1.5%-ном агарозном геле: 1 – лизат L4440, 2 и 3 – полученные из него образцы дцРНК L4440; 4 – лизат *inf4*, 5 и 6 – полученные из него образцы дцРНК *inf1*; 7 – лизат *inf4*, 8 и 9 – полученные из него образцы дцРНК *inf4*. В дорожки 2, 3, 5, 6, 8 и 9 наносили по 5 мкл дцРНК, доведенной до 80 нг/мкл по показаниям спектрофотометра. Дубли соответствуют образцам, независимо выделенным из одной порции лизата. В дорожки 1, 4 и 7 наносили по 3 мкл разведенного в 10 раз исходного лизата. На этом и последующих рисунках над полосами указаны ожидаемые длины соответствующих фрагментов (п.н.). Длина фрагментов соответствует ожидаемой настолько, насколько позволяет определить разница в подвижности дцРНК и ДНК.

Помимо целевой полосы в них можно заметить примесь низкомолекулярных фрагментов, отсутствующую в очищенных образцах, кроме дорожки 8 (в этом образце в п. 5 методики водная фаза была отбрана не полностью). Помимо верхней фазы, содержащей низкомолекулярные фрагменты нуклеиновых кислот, на данном этапе может сформироваться нижняя фаза, представленная остатками хлороформа.

Сравнение предлагаемой методики с фенол-хлороформной экстракцией. Для того чтобы определить, насколько выделение дцРНК с помощью предлагаемой методики может конкурировать с фенол-хлороформной экстракцией, были проведены три серии независимых выделений обеими методиками из трех различных культур бактерий. В качестве тестового штамма был выбран продуцент фрагмента дцРНК гена *infI*. Концентрацию выделенной молекулы измеряли спектрофотометрически (табл. 2) в соответствии с измеренным количеством, аликвоту 400 нг наносили на агарозный гель (рис. 3).

Интенсивность свечения целевой полосы сравнивали с интенсивностью свечения полос мар-

кера молекулярных длин с известным количеством ДНК для определения содержания целевой молекулы в образце (табл. 2). Нам не удалось обнаружить примеры подобного сравнения в других работах по выделению дцРНК. Остается открытый вопрос, насколько можно доверять результатам оценки концентрации на основании сравнения интенсивности свечения полос дцДНК в маркере молекулярных длин и дцРНК в исследуемых образцах. Однако это единственный доступный способ оценить количество именно целевой молекулы в образце. Более точных результатов можно было бы добиться с помощью маркера молекулярных длин, содержащего дцРНК, но такие продукты еще не получили широкого распространения.

Несмотря на совпадение параметров A_{260}/A_{280} и A_{260}/A_{230} , фенол-хлороформная экстракция демонстрирует крайне завышенные значения при спектрофотометрической оценке концентрации. В предыдущей работе нами проводилась двухстадийная очистка дцРНК фенол-хлороформом с обработкой ДНКазой и РНКазой А, которая позволила получить результат, в большей

Таблица 2. Средние показатели выделений дцРНК из трех независимо выращенных культур бактерий

Тип выделения	Выход РНК, мкг/мл культуры	Содержание целевой дцРНК, %
Фенол/хлороформ	7.2 ± 3.4	9.1 ± 2.3
Метанол/хлороформ	1.6 ± 0.5	25.5 ± 5.7

Примечание: из каждой культуры каждым способом выделяли по два образца дцРНК. Содержание целевой молекулы определяли путем сравнения яркости целевой полосы в агарозном геле с полосами известной концентрации в ДНК-маркере молекулярных длин.

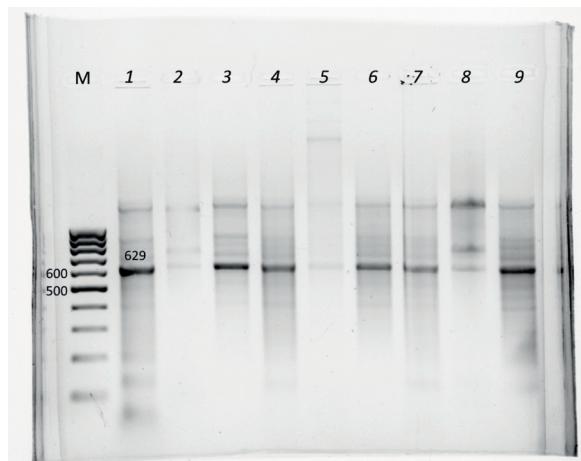


Рис. 3. Сравнение результатов выделения фенол-хлороформом и метанол-хлороформом на примере выделения дцРНК *infI* из *E. coli*: 1, 4 и 7 – лизат; 2, 5 и 8 – образец, выделенный из соответствующего лизата фенол-хлороформом; 3, 6 и 9 – образец, выделенный из соответствующего лизата метанол-хлороформом. В дорожки 2, 3, 5, 6, 8 и 9 наносили по 5 мкл дцРНК, доведенной до 80 нг/мкл по показаниям спектрофотометра. В дорожки 1, 4 и 7 наносили по 2 мкл лизата.

мере соответствующий показаниям спектрофотометра [12]. Тем не менее яркость целевой полосы после такой обработки по-прежнему визуально не соответствовала внесенному количеству дцРНК, и в дорожке сохранялось присутствие нецелевых полос.

К похожему результату пришли авторы в работе [13], где яркость полос дцРНК после фенол-хлороформной экстракции была непостоянной и визуально не соответствовала внесенному в гель количеству нуклеиновой кислоты даже после очистки РНКазой А или селективного осаждения в LiCl. Статья [13] также ставит под сомнение воспроизводимость результатов, ранее полученных в работе [14], т.к. заявленного Ahn et al. использования TURBO-буфера (Thermo Fisher Scientific, США) оказывается недостаточно для защиты дцРНК от гидролиза РНКазой А. Несовпадение легко может быть обусловлено различиями в партиях буфера и РНКазы А, т.к. ее неспособность гидролизовать дцРНК при высоком содержании NaCl – не тот параметр, который обязательно проверяют при производстве. Таким образом, даже добавление этапа очистки не гарантирует получения стабильного воспроизводимого количества целевой молекулы, равно как и отсутствия нецелевых примесей при фенол-хлороформной экстракции.

Распространенный способ повышения выхода РНК и содержания целевой молекулы – применение TRIzol или его аналогов [9, 13, 15], однако такой реагент резко увеличивает стоимость выделения, что неприемлемо для больших объемов. Так, в работе [13] стоимость QIAzol, необходимого для выделения дцРНК из 400 мл культуры, составила 85.5% стоимости всех использованных реагентов.

Таким образом, ни традиционная фенол-хлороформная, ни TRIzol-хлороформная, ни предлагаемая здесь метанол-хлороформная экстракция РНК не позволяет получить очищенную от всех примесей целевую молекулу дцРНК. Тем не менее предлагаемая нами методика не использует дорогих реагентов, заменяет фенол на менее токсичный метанол и позволяет получать стабильное содержание целевой дцРНК в образце в серии выделений без дополнительных этапов очистки (рис. 4). Для повышения выхода целевой дцРНК можно использовать более богатую питательную среду или перейти на культивирование бактерий в ферmentерах, что также значительно повышает

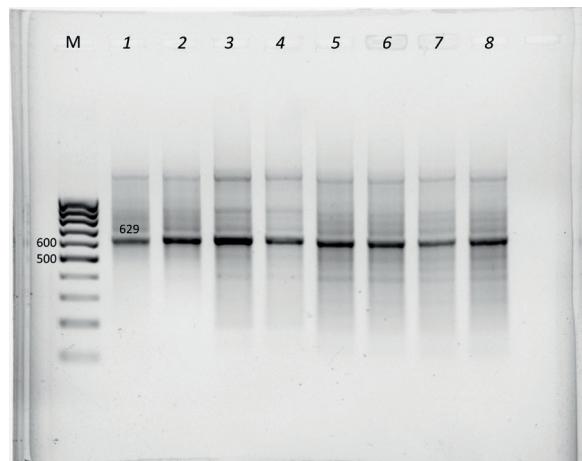


Рис. 4. Результат электрофоретического анализа в 1.5%-ном агарозном геле дцРНК *infI*, полученной в результате серии выделений по предлагаемой методике из нескольких культур бактерий *E. coli*. Данное изображение демонстрирует стабильность работы предлагаемой методики выделения дцРНК. Пары образцов в дорожках 1–2, 3–4, 5–6 и 7–8 соответствуют парным выделениям из четырех различных культур *E. coli*. В дорожки 2–8 наносили по 5 мкл дцРНК, доведенной до 80 нг/мкл по показаниям спектрофотометра.

выход дцРНК из расчета на 1 мл культуры [16]. Стоит отметить, что во всех приведенных в данной работе экспериментах, независимо от методов выделения, наблюдались значительные различия в выходе тотальной РНК между образцами, выделенными из разных культур, в то время как повторности внутри одной культуры практически не различались. Поэтому стабильность процентного содержания целевой молекулы дцРНК в выделенных образцах, на наш взгляд, – важная характеристика именно методики выделения, тогда как выход тотальной РНК во многом зависит от условий культивирования.

Сравнение эффективности температурного и ультразвукового разрушения клеток бактерий. Хотя температурный лизис – по умолчанию более доступный и простой способ разрушения бактериальных клеток, мы решили сравнить, как предлагаемая методика выделения будет работать при применении ультразвука в качестве метода лизиса (рис. 5).

В данном случае выделение дцРНК производили из одной и той же культуры бактерий, несущих плазмиду L4440 со вставкой фрагмента гена *infI*. Всего было произведено по два независимых выделения для каждого метода лизиса.

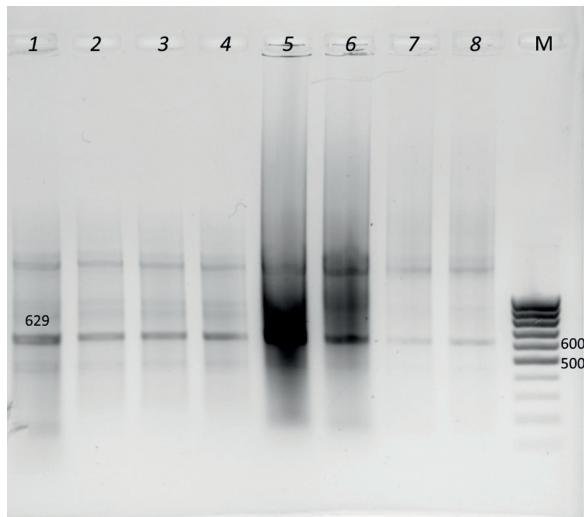


Рис. 5. Электрофоретический анализ в 1.5%-ном агарозном геле д^цРНК *inf1*, выделенной из из *E. coli* после ультразвукового или теплового лизиса клеток. В дорожки 1, 5 и 6 наносили, соответственно, 2 мкл теплового лизата, 2 мкл ультразвукового лизата, 2 мкл разведенного 1 : 2 ультразвукового лизата. В дорожки 2–3 и 7–8 наносили по 5 мкл д^цРНК, доведенной до 40 нг/мкл по показаниям спектрофотометра, выделенной, соответственно, из теплового и ультразвукового лизата. В дорожку 4 наносили д^цРНК, выделенную из теплового лизата без этапа центрифугирования после лизиса.

В дорожке 4 отдельно представлен результат выделения д^цРНК из лизата без этапа центрифугирования сразу после лизиса, можно заметить, что это не повлияло на образец: количество и интенсивность свечения полос, включая целевую полосу в дорожке 4, соответствует дорожкам 2 и 3. Несмотря на более высокие показатели выхода, полученные для ультразвукового лизиса в этом эксперименте (8.5 против 2.7 мкг/мл), обусловленные, очевидно, лучшим лизисом, полосы в дорожках с ультразвуковым лизатом и образцами, выделенными из него, остаются несколько смазанными, что может свидетельствовать о примесях, приводящих к завышению выхода. Об аналогичных затруднениях сообщается и в статье [14], в то время как в работе [13] такая проблема отсутствовала. Вероятно, параметры ультразвукового лизиса можно аккуратно подобрать под конкретный прибор и плотность культуры для минимизации визуальных искажений.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Наработка д^цРНК в бактериях. Культуры бактерий *E. coli* HT115, несущие одну из сле-

дующих плазмид: L4440 без вставки, L4440 со вставкой фрагмента гена *inf1* или L4440 со вставкой фрагмента гена *inf4*, были получены ранее [12] и хранились при –80°C в 7%-ном DMSO. Для наработки д^цРНК замороженные бактерии переносили микробиологической петлей в 50 мл среды LB (триптон 10 г/л, NaCl 10 г/л, дрожжевой экстракт 5 г/л) с добавлением 12.5 мкг/мл тетрациклина и 100 мкг/мл ампициллина. Среду с бактериями инкубировали при 37°C и вращении 200 об/мин в течение 16 ч. Полученную ночную культуру объединяли с 950 мл среды LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина, после чего культуру инкубировали при 37°C и вращении 200 об/мин до OD₅₇₂ = 0.45. Далее в среду добавляли IPTG до концентрации 0.6 mM, после чего культуру оставляли инкубироваться в течение 5 ч. Далее бактерии осаждали центрифугированием (10 000 g, 5 мин), после чего помещали в морозильную камеру (–20°C) на ночь.

Получение грубого лизата. Бактерии размораживали и ресуспендировали в mQ H₂O из расчета 1 мл воды на 50 мл исходной культуры. Полученную суспензию лизировали на водяной бане (95°C, 5 мин) или ультразвуком (60 кГц, 5 раз по 30 с на льду). Далее дополнительно следовало центрифугирование (10 000 g, 5 мин). Данный шаг необходим для хранения лизата, но не требуется при немедленном выделении д^цРНК. К остывшему до комнатной температуры лизату добавляли 400 ед. ДНКазы I (Calbiochem, Германия), смесь инкубировали при 37°C в течение 15 мин. На этом этапе лизат может храниться при –20°C в течение недели без потери д^цРНК и при –80°C не менее года.

Метанол-хлороформная экстракция д^цРНК. Для выделения РНК из грубого лизата, обработанного ДНКазой без использования фенола, была предложена следующая последовательность действий: 1) смешать лизат с равным объемом метанола; 2) добавить хлороформ в количестве 1/8 объема смеси, тщательно перемешать; 3) центрифугировать 15 мин при 15 000 g и 4°C, перенести супернатант в новую емкость; 4) добавить ПЭГ-8000 до конечной концентрации 7.5% и NaCl до конечной концентрации 0.5 M. На этом шаге допустимо добавление деионизованной воды в количестве, не превышающем 0.25 объема супернатанта, чтобы довести компоненты смеси

до требуемых концентраций. Концентрация ПЭГ может быть подобрана под длину целевой молекулы дцРНК; 5) инкубировать смесь 15 мин при 4°C, затем центрифугировать 15 мин при 12 000 *g* и 4°C; 6) тщательно удалить супернатант. Возможно образование нижней фазы, содержащей хлороформ, перенесенный на шаге 3. Необходимо удалить его, не захватив интерфазу, содержащую целевую молекулу; 7) промыть осадок 96%-ным этианолом, предварительно охлажденным до 4°C, использовать не менее 1/3 от объема смеси из шага 4; 8) центрифугировать 5 мин при 12 000 *g* и 4°C, удалить супернатант; 9) промыть осадок 70%-ным этианолом, предварительно охлажденным до 4°C, повторить шаг 8; 10) просушить осадок от остатков этианола при 50°C в течение 5–15 мин (в зависимости от количества осадка), растворить в mQ H₂O из расчета 200 мкл на 1 мл исходного лизата.

Фенол-хлороформная экстракция дцРНК.

Для сравнения с предлагаемой методикой использовали следующий вариант фенол-хлороформной экстракции, приблизительно соответствующий ей по стоимости реагентов и затратам по времени: 1) грубый лизат смешать с равным объемом смеси фенол : хлороформ : изоамиловый спирт (соотношение компонентов 25 : 24 : 1) и инкубировать с перемешиванием 15 мин при 65°C; 2) центрифугировать 15 мин при 15 000 *g* и 4°C, перенести водную фазу в новую емкость; 3) добавить равный объем изопропанола и 0.1 объема 3 М ацетата натрия, инкубировать 15 мин при –20°C; 4) центрифугировать 15 мин при 12 000 *g* и 4°C, удалить супернатант; 5) промыть осадок 96%-ным этианолом, предварительно охлажденным до 4°C, использовать не менее 1/3 от объема смеси из шага 4; 6) центрифугировать 5 мин при 4°C и 12 000 *g*, удалить супернатант; 7) промыть осадок 70%-ным этианолом, предварительно охлажденным до 4°C, повторить шаг 8; 9) просушить осадок от остатков этианола при 50°C в течение 5–15 мин (в зависимости от количества осадка), растворить в mQ H₂O из расчета 200 мкл на 1 мл исходного лизата.

В отличие от метанол-хлороформной экстракции, в данном случае использование 96%-ного этианола при первой промывке и охлаждение спирта до 4°C не влияет на выход дцРНК. Однако поскольку выделение двумя разными методами проводили параллельно, эти шаги были одинаковы для обоих протоколов.

Спектрофотометрическое измерение концентрации дцРНК. Концентрацию выделенной дцРНК оценивали спектрофотометрически на

приборе NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, США). Хотя коэффициент пересчета для дцРНК составляет 46 мкг/мл [17], для подсчета концентрации использовали коэффициент для РНК, т.к. специальных этапов очистки дцРНК от тотальной РНК не проводили. Перед использованием 400 нг каждой фракции дцРНК проверяли путем электрофоретического анализа в агарозном геле.

Гель-электрофорез в агарозном геле. Пропорцию выделенной дцРНК выполняли с помощью электрофоретического анализа. Электрофоретический анализ проводили в 1×TBE-буфере (90 мМ Tris, 90 мМ борная кислота, 2 мМ EDTA) в 1.5%-ном агарозном геле при постоянной напряженности электрического поля 10 В/см, время – 30 мин, оно могло быть увеличено для лучшего разделения фрагментов. Для предотвращения деградации РНК во время гель-электрофореза в гель добавляли отбеливатель Белизна (ООО “ПЭТ-ФОРМ”, Россия) в количестве 0.5% объема геля [18]. Для окрашивания в гель добавляли бромистый этидий до концентрации 0.5 мкг/мл. В качестве маркера молекулярных длин использовали маркер дцДНК 100 п.н. (Biolabmix, Россия). Отклонение в скорости миграции дцРНК от дцДНК для такой концентрации агарозы не превышает 15% от длины молекулы и может зависеть от последовательности [19]. Для визуализации результатов электрофореза использовали ChemiDoc (Bio-Rad, США) и программное обеспечение Imagelab (Bio-Rad, США). В качестве референсных полос для определения количества нуклеиновой кислоты по интенсивности свечения использовали полосы 200–700 п.н. маркера молекулярных длин с известным количеством ДНК, т.к. при заданных параметрах гель-электрофореза для них достигалось наилучшее разделение.

Статистическая обработка результатов. Расчеты средних значений и стандартных отклонений и построение графика для рис. 1 проводили с использованием пакета tidyverse [20] для языка программирования R.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в данной работе представлен результат разработки новой методики очистки дцРНК, наработанной в штамме *E. coli* HT115. Предлагаемая методика позволяет выделять двуцепочечную РНК из *E. coli* без использования фенола или дорогостоящих реагентов. При этом стабильно высокое содержание целевой молекулы достигается без дополнительных этапов очистки, необходимых при фенол-хлороформной

экстракции для получения аналогичного результата. Применение методики будет оправдано в лабораториях, занимающихся как фундаментальными, так и прикладными исследованиями РНК-интерференции. Однако для масштабирования технологии для применения в сельском хозяйстве могут потребоваться корректировки описанного в данной работе протокола.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при поддержке проекта Министерства науки и высшего образования № FWNR-2022-0017.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концептуализация – ГТС; экспериментальные работы – ИАА; написание статьи – ИАА; анализ данных – ИАА; администрирование проекта – ГТС.

Все авторы дали одобрение на окончательный вариант рукописи.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Castel S.E., Martienssen R.A. // Nat. Rev. Genet. 2013. V. 14. P. 100–112.
<https://doi.org/10.1038/nrg3355>
2. Svoboda P. // Front. Plant Sci. 2020. V. 11. P. 1237.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01237>
3. Li H., Guan R., Guo H., Miao X. // Plant Cell Environ. 2015. V. 38. P. 2277–2285.
<https://doi.org/10.1111/pce.12546>
4. Islam M.T., Davis Z., Chen L., Englaender J., Zomorodi S., Frank J., Bartlett K., Somers E., Carballo S.M., Kester M., Shakeel A., Pourtaheri P., Sherif M.S. // Microb. Biotechnol. 2021. V. 14. P. 1847–1856.
<https://doi.org/10.1111/1751-7915.13699>
5. Kalyandurg P.B., Sundararajan P., Dubey M., Ghadamgahi F., Zahid M.A., Whisson S.C., Vetukuri R.R. // Phytopathology. 2021. V. 111. P. 2166–2175.
<https://doi.org/10.1094/phyto-02-21-0054-sc>
6. Mitter N., Worrall E.A., Robinson K.E., Li P., Jain R.G., Taochy C., Fletcher S.J., Carroll B.J., Lu G.Q. (Max), Xu Z.P. // Nat. Plants. 2017. V. 3. P. 1–10.
<https://doi.org/10.1038/nplants.2016.207>
7. Islam M.T., Sherif S.M. // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. P. 2072.
<https://doi.org/10.3390/ijms21062072>
8. Konakalla N.C., Bag S., Deraniyagala A.S., Culbreath A.K., Pappu H.R. // Viruses. 2021. V. 13. P. 662.
<https://doi.org/10.3390/v13040662>
9. Sundaresha S., Sharma S., Bairwa A., Tomar M., Kumar R., Bhardwaj V., Jeevalatha A., Bakade R., Salaria N., Thakur K., Singh B.P., Chakrabarti S.K. // Pest. Manag. Sci. 2022. V. 78. P. 3183–3192.
<https://doi.org/10.1002/ps.6949>
10. Gan D., Zhang J., Jiang H., Jiang T., Zhu S., Cheng B. // Plant Cell Rep. 2010. V. 29. P. 1261–1268.
<https://doi.org/10.1007/s00299-010-0911-z>
11. Tenllado F., Martínez-García B., Vargas M., Díaz-Ruiz J.R. // BMC Biotechnol. 2003. V. 3. P. 3.
<https://doi.org/10.1186/1472-6750-3-3>
12. Ivanov A.A., Golubeva T.S. // J. Fungi. 2023. V. 9. P. 1100.
<https://doi.org/10.3390/jof9111100>
13. Verdonckt T.W., Vanden Broeck J. // Front. Physiol. 2022. V. 13. P. 836106.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2022.836106>
14. Ahn S.-J., Donahue K., Koh Y., Martin R.R., Choi M.-Y. // Int. J. Insect Sci. 2019. V. 11. P. 4032.
<https://doi.org/10.1177/1179543319840323>
15. Wang Z., Li Y., Zhang B., Gao X., Shi M., Zhang S., Zhong S., Zheng Y., Liu X. // Adv. Funct. Mater. 2023. V. 33. P. 3143.
<https://doi.org/10.1002/adfm.202213143>
16. Guan R., Chu D., Han X., Miao X., Li H. // Front. Bioeng. Biotechnol. 2021. V. 9. P. 3790.
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.753790>
17. Strezsak S., Beuning P., Skizim N. // Anal. Methods. 2021. V. 13. P. 179–185.
<https://doi.org/10.1039/D0AY01498B>
18. Aranda P.S., Lajoie D.M., Jorcyk C.L. // Electrophoresis. 2012. V. 33. P. 366–369.
<https://doi.org/10.1002/elps.201100335>
19. Livshits M.A., Amosova O.A., Lyubchenko Y.L. // J. Biomol. Struct. Dyn. 1990. V. 7. P. 1237–1249.
<https://doi.org/10.1080/07391102.1990.10508562>
20. Wickham H., Averick M., Bryan J., Chang W., McGowan L.D'A., François R., Grolemond G., Hayes A., Henry L., Hester J., Kuhn M., Pedersen L.T., Miller E., Bache M.S., Muller K., Ooms J., Robinson D., Seidel P.D., Spinu V., Takahashi K., Vaughan D., Wilke C., Woo K., Yutani H. // J. Open Source Softw. 2019. V. 4. P. 1686.
<https://doi.org/10.21105/joss.01686>

A Phenol-Free Method for the Robust Isolation of the Double-Stranded RNA Produced in the *E. coli* HT115 Strain

A. A. Ivanov*, **, # and T. S. Golubeva*, ***

Phone: +7 (995) 499-25-94; e-mail: a.ivanov2@g.nsu.ru

* Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences,
prosp. Acad. Lavrentieva 10, Novosibirsk, 630090 Russia

** Novosibirsk State University, ul. Pirogova 2, Novosibirsk, 630090 Russia

*** Immanuel Kant Baltic Federal University,
ul. Aleksandra Nevskogo 14, Kaliningrad, 236041 Russia

Obtaining a fraction of double-stranded RNA is an integral part of any RNA interference research whether it aimed at solving fundamental or applied problems. The production of dsRNA in bacterial culture is a common technique due to its comparative cheapness and scaling-up opportunities. In this article, we propose a new method for fast and effective isolation of dsRNA from bacterial culture, as an alternative to classical phenol-chloroform extraction. In our method, phenol is replaced with less toxic methanol, and the total RNA thus isolated from bacteria contains up to 25% of the target molecule lacking the DNA contamination, which enables its usage in certain further applications without additional cleanup steps. The application of this methodology will be justified in laboratories engaged in either fundamental or applied research on RNA interference. However, scaling the technology for agricultural use may require adjustments to the protocol described in this work.

Keywords: double-stranded RNA, RNA isolation, bacterial production of dsRNA, RNA interference, spray-induced gene silencing