

Название изобретения.

**СПОСОБ ВЫДЕЛЕНИЯ ОТДЕЛЬНЫХ ТИПОВ МИКРОРНК ИЗ
БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ, СОДЕРЖАЩИХ ЭКЗОСОМЫ.**

5

Область техники.

Изобретение относится к молекулярной биологии, в частности, к способам выделения микроРНК из биологических жидкостей и предназначено для выделения различных типов микроРНК из различных экзосомосодержащих биологических материалов для
10 оценки отдельных фракций экзосом.

Предшествующий уровень техники.

Экзосомы - маленькие, 20–100 нм, сферические пузырьки, формируемые клеткой для межклеточных взаимодействий. В
15 экзосомах содержатся комплексы белков и микроРНК, которые представляют ценность как диагностические маркеры, а также могут использоваться для формирования иммунного ответа в онкологии. Однако, для эффективного использования экзосом необходимо получение чистой фракции.

20

Экзосомы стабильны в биологических жидкостях, крови, моче, слюне, асците или культуральной жидкости в случае культивирования. Это делает доступной не инвазивную диагностику экзосом опухолевого происхождения в плазме крови и моче.

Экзосомы активно выделяются клетками иммунной системы –
25 дендритные клетки и В-лимфоциты, клетками нервной ткани,

секреторных тканей и особенно опухолевыми клетками [K.Denzer et al. 2000, Huber et al. 2005, P.Wwearsch 2009]. В случае дендритных клеток выделяются экзосомы содержащие маленькие (8-12 аминокислот) презентованные полипептиды в комплексе антигеном

5 МНС I, присоединяющиеся к соответствующим рецепторам на CD8 цитотоксических Т-лимфоцитах, НК-клетках, а также в комплексе с МНС II, содержащие большие (12-16 аминокислот) презентированные полипептиды, к соответствующим рецепторам на CD4 цитотоксических Т-лимфоцитах. Экзосомы, выделяющиеся

10 опухолевыми клетками, могут нарушать формирование противоопухолевого ответа цитотоксических Т-клеток за счет конкуренции с экзосомами дендритных клеток или макрофагов, учитывая, что концентрация экзосом увеличивается в плазме/сыворотке крови примерно в 50 раз при развитии рака

15 [Taylor et al 2008, Iero 2008].

Экзосомы содержат антигены МНС I и МНС II комплекса гистосовместимости, Rab-белки ряд интегринов, а также антигены и наборы микроРНК, определяемые тканевой принадлежностью и индивидуальными особенностями типа клеток. Так в экзосомах из

20 мочи человека обнаружено присутствие 295 белков [Pisitkun et al. 2004]. Около 50 белков встречаются регулярно во всех экзосомах [Gonzales et.al, 2009]. В случае опухолей тканеспецифический набор белков и опухолевоспецифический набор микроРНК может использоваться для ранней диагностики или обоснования схемы

25 лечения [Baj-Krzyworzeka et al. 2007].

Для изучения специфических опухолевых экзосом необходимо их дифференцировать. Концентрация конкретных микроРНК является в таком случае критерием отбора экзосом из конкретных клеток.

- 5 Известен способ выделения экзосом из биологических жидкостей (см. ссылку из сети Интернет http://tsitologiya.cytspb.rssi.ru/54_5/shtam_ms.pdf), где собирают культуральную конденсированную среду (КС), проводят последовательное центрифугирование в режиме 2000 и 10000 g, 10 далее полученную КС объемом 500 мл концентрируют с помощью ультрафильтрации (Центрикон плюс-70, 100 кДа, Millipore) до конечного объема 10 мл. В дальнейшем для выделения экзосом из полученных препаратов концентрированной КС применяют ультрацентрифугирование на центрифуге Avanti 30I (ротор JA- 15 30.50) в режиме 100000 g в течение 2 ч. После центрифугирования надосадочную жидкость собирают в отдельную пробирку и исследуют методом лазерной корреляционной спектроскопии (ЛКС) для проверки удаления из нее частиц экзосомального размера, осадок растворяют в максимальном объеме фосфатно-солевого 20 буфера (PBS) и повторно центрифугируют при тех же условиях. Полученный осадок растворяют в 100 мкл воды (MiliQ) или PBS, разбивают на аликвоты, которые замораживают при -80°C для дальнейших протеомных исследований.

- Известный метод не позволяет разделить экзосомы на 25 различные фракции, относящиеся к различным тканям, а,

следовательно, и осуществить оценку уровня микроРНК в выделенных образцах.

Сущность изобретения.

5

Краткое описание чертежей.

На Фиг. 1 представлена таблица распределения микроРНК, выделенной из 500 мл мочи здорового донора по лункам. Концентрация представлена как log с основанием 2 копий микроРНК в микролитре.

10

На Фиг. 2 представлена таблица распределения микроРНК, выделенной из 500 мл мочи пациента с аденокарциномой легких по лункам. Концентрация представлена как log с основанием 2 копий микроРНК в микролитре.

15

Осуществление изобретения.

Техническим эффектом заявленного способа является возможность выделения отдельных типов микроРНК из биологических жидкостей, содержащих экзосомы, в частности, возможность выделения отдельных типов, например, тканеспецифичных и опухолевоспецифичных микроРНК в дальнейшем позволит создавать вакцины, основанные на экзосомах из опухолевых клеток.

20

Вышеприведенный технический результат достигается тем, что в способе выделения отдельных типов микроРНК из биологических

25

жидкостей, содержащих экзосомы, включающем последовательное центрифугирование в режиме 2000 и 10000 g, ультрафильтрацию полученной надосадочной жидкости на центрифужном концентраторе Центрикон плюс-70, 100 кДа, Millipore до конечного объема 10 мл, ультрацентрифугирование на центрифуге Avanti 30I (ротор JA-30.50) в режиме 100000 g в течение 2 ч, растворение полученного осадка в фосфатно-солевом буфере, повторное центрифугирование при тех же условиях, и растворение полученного осадка в 100 мкл воды, согласно настоящему изобретению, далее полученный раствор подвергают электрофорезу в свободном потоке в бункерах для анодной и катодной стабилизации на приборе FFE System с последующим сбором отдельных фракций при следующих условиях: общее время проведения электрофореза 5 мин, подаваемое напряжение 900 В и ток 34 мА, образец и маркер вводят при скорости потока 2,5 мл/ч и 280 мл/ч соответственно, пробег проводят в режиме циклического интервала FF-ZE при 85 мл/ч и фракционированный образец элюируют при 320 мл/ч, для анодной стабилизации используют следующий буфер: 1,5М тиомочевина + 6 М мочевины + 100 мМ H_2SO_4 + 25 мМ 2-пиридин-пропанол + 300 мМ 2-пиридин-этанол; Среда для разделения имеет следующий состав: 1,8 М тиомочевина + 6 М мочевины + 55 мМ MOPS + 55 мМ 2-пиридин-пропанол; для катодной стабилизации используют следующий буфер: 1,8 М тиомочевина + 76 М мочевины + 180 мМ NaOH + 25 мМ Трис + 35 мМ МОПС + 280 мМ EPPS, далее отдельные фракции повторно

ультрацентрифугируют на центрифуге Avanti 30I (ротор JA-30.50) в режиме 100000 g в течение 2 ч, затем проводят выделение микроРНК из каждой отдельной фракции, а именно, в каждую из отдельных фракций добавляют 5 мкМ протеиназы К, инкубируют при 56°C в течение 1 ч, далее наносят на колонку Exiqon, после чего проводят центрифугирование при 2000 g, затем колонку промывают 3 раза промывочным буфером, после каждого промывания проводят центрифугирование при 2000 g на центрифуге eppendorf 5104, потом на колонку наносится 20 мкл безнуклеазной воды, далее колонку оставляют на 10 мин при комнатной температуре, а затем центрифугируют при 3000 g, после чего проводят реакцию обратной транскрипции при помощи обратной транскриптазы (Exiqon), а именно, к 8 мкл образца добавляют 8 мкл реагента и инкубируют в течение 1 ч при температуре 60°C, после чего реакцию останавливают нагреванием до 95°C в течение 5 мин.

Далее, с целью выявления отдельных типов микроРНК проводят полимеразную цепную реакцию с детекцией в реальном времени на приборе 7500 Applied Biosystems спраймерами на отдельные типы, например, тканеспецифичных и опухолевоспецифичных микроРНК, а именно: miR-141, miR-200a, miR-200c, miR-203, miR-205, miR-214, miR-17-3p, miR-106a, miR-146, miR-155, miR-191, miR-192, miR-301a, miR-326, miR-331-3p, miR-432, miR-438, miR-574-3p, miR-625*, miR-92a, miR-584, miR-517c, miR-378, miR-520f, miR-142-5p, miR-451, miR-518d, miR-29a, miR-650, miR-151, miR-19b, miR-29c.

Затем при помощи программы GenEx qPCR software, вычисляют количество каждой из исследуемых микроРНК, выделенной из каждой фракции, после чего полученные данные сводят в таблицу для сравнения профилей экспрессии микроРНК в образцах из разных тканей.

Пример исследования:

600 мл мочи, взятой у здорового донора подвергают последовательному центрифугированию в режиме 2000 и 10000 g, далее полученную надосадочную жидкость объемом 500 мл концентрируют с помощью ультрафильтрации (Центрикон плюс-70, 100 кДа, Millipore) до конечного объема 10 мл. В дальнейшем для выделения экзосом применяют ультрацентрифугирование на центрифуге Avanti 30I (ротор JA-30.50) в режиме 100000 g в течение 2 ч. После центрифугирования надосадочную жидкость собирают в отдельную пробирку и исследуют методом лазерной корреляционной спектроскопии (ЛКС) для проверки удаления из нее частиц экзосомального размера, осадок растворяют в максимальном объеме фосфатно-солевого буфера (PBS) и повторно центрифугируют при тех же условиях. Полученный осадок растворяют в 100 мкл воды (MiliQ) или PBS, далее исследуемый образец подвергают электрофорезу в свободном потоке в специальных буферах на приборе FFE system (FFE Service GmbH) при следующих условиях: общее время проведения электрофореза 5 мин, подаваемое напряжение 900 В и ток 34 мА. Образец и маркер были введены при скорости потока 2,5 мл/ч и 280 мл/ч

соответственно. Пробег проводили в режиме циклического интервала FF-ZE при 85 мл/ч и фракционированный образец элюируют при 320 мл/ч. Для анодной стабилизации используют следующий буфер: 1,5М тиомочевина + 6 М мочевины + 100 мМ H₂SO₄ + 25 мМ 2-пиридин-пропанол + 300 мМ 2-пиридин-этанол; Среда для разделения имеет следующий состав: 1,8 М тиомочевина + 6 М мочевины + 55 мМ MOPS + 55 мМ 2-пиридин-пропанол; для катодной стабилизации используют следующий буфер: 1,8 М тиомочевина + 76 М мочевины + 180 мМ NaOH + 25 мМ Трис + 35 мМ МОПС + 280 мМ EPPS, с последующим сбором отдельных фракций, концентрированием образцов из отдельных лунок при помощи повторного ультрацентрифугирования на центрифуге Avanti 30I (ротор JA-30.50) в режиме 100000 g в течение 2 ч. Затем проводят выделение микроРНК по следующей методике: в образец добавляют 5 мкМ протеиназы К, инкубируют при 56°C в течение 1 ч, затем используют колонки Exiqon, для очистки микроРНК — образец наносят на колонку, после чего проводят центрифугирование при 2000 g на центрифуге erppendorf 5104, затем колонку 3 раза промывают промывочным буфером, после каждого промывания проводят центрифугирование при 2000 g на центрифуге erppendorf 5104, потом на колонку наносится 20 мкл безнуклеазной воды. Колонку оставляют на 10 мин при комнатной температуре, а потом центрифугируют при 3000 g на центрифуге erppendorf 5104, после чего проводят реакцию обратной транскрипции при помощи обратной транскриптазы (Exiqon), для этого к 8 мкл образца

добавляют 8 мкл реагента и инкубируют в течение 1 ч при температуре 60°C, после чего реакцию останавливают нагреванием до 95°C в течение 5 мин. Затем проводят полимеразную цепную реакцию с детекцией в реальном времени на приборе 7500 Applied Biosystems, с праймерами на следующие микроРНК: miR-141, miR-200a, miR-200c, miR-203, miR-205, miR-214, miR-17-3p, miR-106a, miR-146, miR-155, miR-191, miR-192, miR-301a, miR-326, miR-331-3p, miR-432, miR-438, miR-574-3p, miR-625*, miR-92a, miR-584, miR-517c, miR-378, miR-520f, miR-142-5p, miR-451, miR-518d, miR-29a, miR-650, miR-151, miR-19b, miR-29c результаты анализируют при помощи программы GenEx qPCR software и оформляют в виде таблицы (см. Фиг.1).

Затем, 600 мл мочи, взятой у пациента с раком молочной железы подвергают последовательному центрифугированию в режиме 2000 и 10000 g, далее полученную надосадочную жидкость объемом 500 мл концентрируют с помощью ультрафильтрации (Центрикон плюс-70, 100 кДа, Millipore) до конечного объема 10 мл. В дальнейшем для выделения экзосом применяют ультрацентрифугирование на центрифуге Avanti 30I (ротор JA-30.50) в режиме 100000 g в течение 2 ч. После центрифугирования надосадочную жидкость собирают в отдельную пробирку и исследуют методом лазерной корреляционной спектроскопии (ЛКС) для проверки удаления из нее частиц экзосомального размера, осадок растворяют в максимальном объеме фосфатно-солевого буфера (PBS) и повторно центрифугируют при тех же условиях.

Полученный осадок растворяют в 100 мкл воды (MiliQ) или PBS, далее исследуемый образец подвергают электрофорезу в свободном потоке в специальных буферах на приборе FFE system (FFE Service GmbH) при следующих условиях: общее время проведения электрофореза 5 мин, подаваемое напряжение 900 В и ток 34 мА. Образец и маркер были введены при скорости потока 2,5 мл/ч и 280 мл/ч соответственно. Пробег проводили в режиме циклического интервала FF-ZE при 85 мл/ч и фракционированный образец элюируют при 320 мл/ч. Для анодной стабилизации используют следующий буфер: 1,5М тиомочевины + 6 М мочевины + 100 мМ H_2SO_4 + 25 мМ 2-пиридин-пропанол + 300 мМ 2-пиридин-этанол; Среда для разделения имеет следующий состав: 1,8 М тиомочевины + 6 М мочевины + 55 мМ MOPS + 55 мМ 2-пиридин-пропанол; для катодной стабилизации используют следующий буфер: 1,8 М тиомочевины + 76 М мочевины + 180 мМ NaOH + 25 мМ Трис + 35 мМ МОПС + 280 мМ EPPS, с последующим сбором отдельных фракций, концентрированием образцов из отдельных лунок при помощи повторного ультрацентрифугирования на центрифуге Avanti 30I (ротор JA-30.50) в режиме 100000 g в течение 2 ч. Затем проводят выделение микроРНК по следующей методике: в образец добавляют 5 мкМ протеиназы К, инкубируют при 56°C в течение 1 ч, затем используют колонки Exiqon, для очистки микроРНК — образец наносят на колонку, после чего проводят центрифугирование при 2000 g на центрифуге eppendorf 5104, затем колонку 3 раза промывают промывочным буфером фирмы Exiqon,

после каждого промывания проводят центрифугирование при 2000 g на центрифуге erppendorf 5104, потом на колонку наносится 20 мкл безнуклеазной воды. Колонку оставляют на 10 мин при комнатной температуре, а потом центрифугируют при 3000 g на центрифуге erppendorf 5104, после чего проводят реакцию обратной транскрипции при помощи обратной транскриптазы (Exiqon), для этого к 8 мкл образца добавляют 8 мкл реагента и инкубируют в течение 1 ч при температуре 60°C, после чего реакцию останавливают нагреванием до 95°C в течение 5 мин. Затем

5 проводят полимеразную цепную реакцию с детекцией в реальном времени на приборе 7500 Applied Biosystems, с праймерами на следующие микроРНК: miR-141, miR-200a, miR-200c, miR-203, miR-205, miR-214, miR-17-3p, miR-106a, miR-146, miR-155, miR-191, miR-192, miR-301a, miR-326, miR-331-3p, miR-432, miR-438, miR-

15 574-3p, miR-625*, miR-92a, miR-584, miR-517c, miR-378, miR-520f, miR-142-5p, miR-451, miR-518d, miR-29a, miR-650, miR-151, miR-19b, miR-29c, результаты анализируют при помощи компьютерной программы GenEx qPCR software и оформляют в виде таблицы (см. Фиг.2).

20 Как видно из таблиц, представленных на Фиг. 1 и 2, в лунках 61 – 66 микроРНК miR-17-3p, miR-106a, miR-146, miR-155, miR-191, miR-192 наблюдаются только у пациента с аденокарциномой легких и не выявляется у здорового донора, что указывает на то, что в эти лунки попадают только экзосомы из опухолевых клеток

25 аденокарциномы легких, следовательно, заявленным способом

возможно выделять чистые фракции отдельных типов микроРНК, в том числе тканеспецифичных и опухолеспецифичных микроРНК, из биологических жидкостей, содержащих экзосомы.

5

10

15

20

25

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ выделения отдельных типов микроРНК из биологических жидкостей, содержащих экзосомы, включающий

5 последовательное центрифугирование в режиме 2000 и 10000 g, ультрафильтрацию полученной надосадочной жидкости на центрифужном концентраторе Центрикон плюс-70, 100 кДа, Millipore до конечного объема 10 мл и ультрацентрифугирование на центрифуге Avanti 30I (ротор JA-30.50) в режиме 100000 g в течение

10 2 ч, далее полученный осадок растворяют в фосфатно-солевом буфере и повторно центрифугируют при тех же условиях, затем полученный осадок растворяют в 100 мкл воды, отличающийся тем, что далее полученный раствор подвергают электрофорезу в свободном потоке в бункерах для анодной и катодной стабилизации

15 на приборе FFE System с последующим сбором отдельных фракций при следующих условиях: общее время проведения электрофореза 5 мин, подаваемое напряжение 900 В и ток 34 мА, образец и маркер вводят при скорости потока 2,5 мл/ч и 280 мл/ч соответственно, пробег проводят в режиме циклического интервала FF-ZE при

20 85 мл/ч и фракционированный образец элюируют при 320 мл/ч, для анодной стабилизации используют следующий буфер: 1,5 М тиомочевины + 6 М мочевины + 100 мМ H₂SO₄ + 25 мМ 2-пиридин-пропанол + 300 мМ 2-пиридин-этанол; среда для разделения имеет следующий состав: 1,8 М тиомочевины + 6 М

25 мочевины + 55 мМ MOPS + 55 мМ 2-пиридин-пропанол; для

катодной стабилизации используют следующий буфер: 1,8 М тиомочевины + 76 М мочевины + 180 мМ NaOH + 25 мМ Трис + 35 мМ МОПС + 280 мМ EPPS, далее отдельные фракции повторно ультрацентрифугируют на центрифуге Avanti 301 (ротор JA-30.50) в
5 режиме 100000 g в течение 2 ч, затем проводят выделение микроРНК из каждой отдельной фракции, а именно, в каждую из отдельных фракций добавляют 5 мкМ протеиназы К, инкубируют при 56°C в течение 1 ч, далее наносят на колонку Exiqon, после чего проводят центрифугирование при 2000 g, затем колонку промывают
10 3 раза промывочным буфером, после каждого промывания проводят центрифугирование при 2000 g на центрифуге erpendorf 5104, потом на колонку наносится 20 мкл безнуклеазной воды, далее колонку оставляют на 10 мин при комнатной температуре, а затем центрифугируют при 3000 g, после чего проводят реакцию обратной
15 транскрипции при помощи обратной транскриптазы (Exiqon), а именно, к 8 мкл образца добавляют 8 мкл реагента и инкубируют в течение 1 ч при температуре 60°C, после чего реакцию останавливают нагреванием до 95°C в течение 5 мин.

20

25