

# Необходимость стандартизации и валидации метода ПЦР в реальном времени для определения зрелой miR-21 в крови пациентов

Шуленина Л.В., Салеева Д.В.

ФГБУ ГНЦ Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И.Бурназяна ФМБА России  
123098, г. Москва, ул. Живописная, д.46

Процессы обнаружения и количественного определения методом ПЦР в реальном времени в крови пациентов зрелых микроРНК, в том числе и miR-21, должны быть стандартизированы и валидированы. Проведенные нами исследования, показывают, что специфичность метода ПЦР для miR-21 в крови здоровых доноров может быть продемонстрирована образованием продукта-ампликона размером 67 нуклеотидов, прецизионность в условиях сходимости и воспроизводимости, выраженная в виде коэффициента вариации, составляет менее 2% и 3% соответственно, а линейность метода подтверждается коэффициентом корреляции  $r \geq 0,99$ .

**Ключевые слова:** miR-21, кровь, ПЦР в реальном времени, стандартизация, валидация.

**Для цитирования:** Шуленина Л.В., Салеева Д.В. Необходимость стандартизации и валидации метода ПЦР в реальном времени для определения зрелой miR-21 в крови пациентов. *Медицинская генетика* 2020; 19(12): 66-67.

**DOI:** 10.25557/2073-7998.2020.12.66-67

**Автор для корреспонденции:** Шуленина Л.В.; e-mail: shulenina2010@mail.ru

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках бюджетной темы НИР (шифр «Технология-1»).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Поступила:** 20.05.2020.

## *The importance for standardization and validation of real-time PCR for the detection of mature miR-21 in the blood of patients*

Shulenina L.V., Saleeva D.V.

State Research Center of Russian Federation – Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency  
Zhivopisnaya str., 46, Moscow, 123098, Russia

The processes of detection and quantification by real-time PCR in blood of mature microRNAs, including miR-21, should be standardized and validated. Our studies show that the specificity of PCR method for miR-21 in the blood of healthy donors can be demonstrated by the formation of a 67 bp amplicon product, precision under conditions of convergence and reproducibility, expressed using the coefficient of variation, is less than 2% and 3%, respectively, and the linearity of PCR method for miR-21 is confirmed by the correlation coefficient  $r \geq 0.99$ .

**Key words:** miR-21, blood, PCR real time, standardization, validation.

**For citation:** Shulenina L.V., Saleeva D.V. The importance for standardization and validation of real-time PCR for the detection of mature miR-21 in the blood of patients. *Medical genetics*. 2020; 19(12): 66-67. (In Rus.).

**DOI:** 10.25557/2073-7998.2020.12.66-67

**Corresponding author:** Shulenina L.V.; e-mail: shulenina2010@mail.ru

**Funding.** The work was performed as part of the budgetary research project (code "Technology-1").

**Conflict of interest.** Authors declare no conflict of interest

**Accepted:** 20.05.2020.

МикроРНК (miR) — класс эволюционно консервативных регуляторных РНК длиной от 19 до 22 нуклеотидов, которые модулируют активность генов и участвуют в формировании различных патологий. Исследования содержания miR в тканях и биологических жидкостях в клинике необходимы как для диагностических, так и терапевтических целей. Отсутствие единого руководства для подготовки образцов и измерения концентрации miR в крови в настоящее время существенно подавляет энтузиазм их применения.

Известно, что кровь представляет собой среду, в которой клетки обмениваются друг с другом информацией с помощью регуляторных РНК, защищенных от активности РНКаз белковыми комплексами (HDL, NPM1 и Ago2) или липидными везикулами. Обнаружено, что экзосомальный miR-21 подавляет апоптоз клеток и активирует пролиферацию, воздействуя на сигнальный путь PI3K/Akt путем нацеливания на PTEN. Однако количественное измерение циркулирующей miR-21 имеет проблемы воспроизводимости результатов различных

исследований, проведенных как в научных, так и в клинических лабораториях и опубликованных в литературе. Это связано со многими факторами, такими как тип и время сбора биоматериала, условия его хранения, метод выделения РНК, измерительная платформа и физическое состояние донора. Существует несколько рекомендаций по стандартизации молекулярно-биологических методов исследований таких, как микрочипы, ПЦР в реальном времени, капельная ПЦР, секвенирование [1].

**Целью** данной работы была оценка пригодности (валидация) метода ПЦР в реальном времени для количественного определения содержания зрелой miR-21 в крови здоровых доноров. Для достижения данной цели были поставлены задачи определить специфичность, прецизионность и линейность ПЦР в реальном времени по пороговому циклу амплификации Ct в исследуемых пробах.

### Материалы и методы

Общую РНК, содержащую фракцию зрелой miR-21, из замороженной (-20°C) крови здоровых мужчин-доноров (20 человек) выделяли тризольным методом с использованием набора Trizol RNA Prep 100 (ООО Лаборатория Изоген, Россия) в соответствии с протоколом фирмы-производителя. Реакцию обратной транскрипции осуществляли по технологии «stem loop» с помощью «TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit» (Applied Biosystems, США) согласно условиям фирмы-производителя. ПЦР в реальном времени проводили на амплификаторе «DTprime 5M3» (НПО ДНК-Технология, Россия) с применением красителя SYBR Green I (Thermo Scientific, США). Олигонуклеотидные последовательности всех специфических праймеров, использованных в работе, и их концентрация были следующие:

«stem-loop»: 5'-CTCAACTGGTGTCTCGTGGAGTCG GCAATTCAGTTGAGTCAACATC-3/(50 нМ);

miR-21-F-5'-ACACTCCAGCTGGGTAGCTTAT-CAGACTGA-3'(500 нМ);

miR-21-R-5'-GTGTCGTGGAGTCGGCAATTC-3/(500 нМ).

Программа амплификации кДНК miR-21 включала в себя этапы: 95°C/10 мин, далее 35 циклов 95°C/15 с, 60°C/45 с. Для оценки специфичности ПЦР продукты амплификации анализировали по кривым плавления в диапазоне температур от 55 до 95°C с шагом 1°C/15 с и проводили электрофорез в агарозе.

Прецизионность ПЦР в условиях сходимости (один оператор на одном приборе в 4-х повторениях) и воспроизводимости (два оператора в разных лабораториях в 4-х повторениях) выражали в виде абсолютного и относительного показателей вариации порогового цикла амплификации Ct.

Линейную зависимость порогового цикла амплификации и содержания miR-21 проверяли, определяя Ct для 40 проб с различными количествами кДНК (неразведенная, разведенная в 5, 25, 125 и 625 раз) в 5 повторениях. Данные обрабатывали методом наименьших квадратов и вычисляли коэффициент корреляции (r).

### Результаты

Анализ кривых плавления продуктов ПЦР в реальном времени выявил один температурный пик в области 76,5°C, а электрофореграмма показала, что молекулярный вес продукта, полученного после амплификации проб у мужчин-доноров, соответствовал расчетному и составлял 67 нуклеотидов для miR-21. В отрицательных контролях не обнаружены РНК-продукты. Относительный коэффициент вариации порогового цикла Ct в условиях сходимости составил не более 2%, а в условиях воспроизводимости не более 3%. Проверка линейной зависимости порогового цикла Ct от разведения miR-21 с использованием регрессионного анализа показала высокий коэффициент корреляции данных (r=0,99).

Таким образом, нами установлено, что метод ПЦР в реальном времени дает достоверные и надежные результаты количественного определения зрелой miR-21 в крови здоровых пациентов в условиях научно-исследовательских лабораторий. Проведенная валидация метода по показателям специфичность, прецизионность, линейность позволяет получать значения Ct, соответствующие заявленным критериям [2, 3].

### Литература

1. Sanders R., Bustin S., Huggett J., Mason D. Improving the standardization of mRNA measurement by RT-qPCR. *Biomol Detect Quantif.* 2018;15:13-17. doi: 10.1016/j.bdq.2018.03.001.
2. Носырев П., Носырева М., Рассказова Т., Корнеева Н. Валидация аналитических методик: теория и практика. (Часть 1). Ремедиум. 2003; 10: 69-71
3. ГОСТ Р ИСО 5725-2002. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. <http://docs.cntd.ru/document/1200029975>

### References

1. Sanders R., Bustin S., Huggett J., Mason D. Improving the standardization of mRNA measurement by RT-qPCR. *Biomol Detect Quantif.* 2018;15:13-17. doi: 10.1016/j.bdq.2018.03.001.
2. Nosyrev P., Nosyreva M., Rasskazova T., Korneeva N. Validatsiya analiticheskikh metodik: teoriya i praktika. (Chast' 1) Validation of analytical techniques: theory and practice. (Part 1). *Remedium.* 2003; 10: 69-71. (In Russ.)
3. Gosudarstvennyy standart Rossiyskoy Federatsii ISO 5725-2002 Tochnost' (pravil'nost' i pretsizionnost') metodov i rezul'tatov izmereniy [State standard of the Russian Federation ISO 5725-2002 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results]. <http://docs.cntd.ru/document/1200029975> (In Russ.)