Вестник Томского государственного университета. Биология. 2020. № 51. С. 123–140

УДК 57.088
doi: 10.17223/19988591/51/7

О.К. Мурган, А.Д. Казакова, М.В. Ефимова

Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск, Россия

Сравнение методов экстракции РНК из растения картофеля для проведения ПЦР в реальном времени

Работа поддержана грантом РФФИ № 20-34-90094.

Экстракция нуклеиновых кислот – основной этап молекулярной биологии. В настоящее время существует большое количество протоколов и методических рекомендаций для экстракции РНК и ДНК из разных групп организмов. От выбора соответствующего метода и в конечном итоге качества пробы РНК напрямую зависит результат проведения высокочувствительных методов, например полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР РВ). Сложности, возникающие при экстракции РНК из растительной ткани, связаны с присутствием в растениях большого количества вторичных метаболитов и полисахаридов. Проведено сравнение трех методов экстракции РНК из листьев растений картофеля (Solanum tuberosum L.) сорта Луговской с целью дальнейшего исследования экспрессии генов. Качество экстрагируемой РНК и ее количество оценивали спектрофотометрически, с помощью электрофореза в агарозном геле и применения метода кратных разведений для ПЦР в реальном времени. Показано, что для растений картофеля наиболее подходящим является коммерческий набор фирмы Qiagen из-за наименьшего ингибирующего влияния на протекание ПЦР, другие применяемые методы нуждаются в модификациях по очищению образца РНК от ингибиторов реакции.

Ключевые слова: *Solanum tuberosum* L.; *РНК; фенол; электрофорез; наноспектрофотометр; ПЦР в реальном времени.*

Введение

Применение молекулярных методов позволяет решать как фундаментальные, так и прикладные вопросы биологии. Данное направление в методологии появилось сравнительно недавно – в 1950-х гг. [1]. К настоящему времени доля молекулярных исследований продолжает стремительно увеличиваться, в том числе в области ботаники и физиологии растений. Использование данных подходов позволяет определить не только систематическое положение организма, но и выявить дифференциальную экспрессию тех или иных групп генов в ответ на действие регуляторных факторов [2]. Процесс экстракции РНК подразумевает следующие основные этапы – лизис (разрушение) клетки, экстракцию макромолекул и очистку РНК. Основные

способы их проведения описаны ещё в 1987 г. [3]. Однако из-за низкой повторяемости экспериментов потребность в формировании оценки качества полученного препарата нуклеиновой кислоты для исследуемых образцов появилась только в начале 2000-х гг. [4–8]. В 2009 г. разработаны минимальные требования для опубликования результатов ПЦР в реальном времени (ПЦР РВ) – MIQE (Minimum Information for publication of Quantitative real-time Experiments), в которых также прописаны требования к образцам РНК и ДНК: допустимое присутствие примесей белков и полисахаридов, концентрация и целостность препарата [9]. Экстракция РНК необходима не только для проведения ПЦР РВ, но и для ряда других манипуляций (секвенирование, определение вирусной нагрузки и т.д.), в ходе выполнения которых рекомендации могут быть дополнены. К примеру, для реализации задач, связанных с изучением полного транскриптома, необходимо получение образца, характеризующегося не только высоким содержанием мРНК и коротких интерферирующих последовательностей, но и отсутствием рибонуклеаз (РНКаз) и ингибиторов ПЦР [10]. Известно, что способ осуществления этапов экстракции нуклеиновых кислот (НК) напрямую определяет параметры получаемого образца РНК [3, 9]. Среди методических статей, посвящённых молекулярным исследованиям в области физиологии растений, основной интерес уделяется способам экстракции тотальной РНК с использованием экстракционного буфера с сильным окислителем – гуанидинтиоционатом и фенолом (например, реагентов TRIzol™ и Tri Reagent® (Invitrogen, США)) [11, 12], LiCl и/или NaCl [13, 14], а также диоксида кремния, включая колонки для центрифугирования (далее спин-колонки) фирм Qiagen (Германия), Norgen Biotek (Канада) и Invitrogen (США)) [15–17]. В основном при экстракции коротких последовательностей из тканей различного происхождения оценивают эффективность методов, в которых применяются или фенол в составе буфера с кислым pH, или спин-колонки, или их совместное использование [18–23].

Сложность экстракции НК определяется химическим составом растений, в связи с чем универсальных методологических рекомендаций для каждого вида растений не существует. Необходимо проводить сравнение методов экстракции для объектов-интересантов и при необходимости осуществлять модификации этапов, направленные на улучшение качества экстрагируемых препаратов НК; степень чистоты последних определяет корректность и достоверность результатов молекулярных исследований и их практических приложений [6, 17, 24–28].

Относительно растений картофеля на данный момент не существует стандартного метода экстракции нуклеиновых кислот. В то же время картофель, являясь одним из важных объектов исследования, отличается высоким содержанием полисахаридов, в связи с чем усложняется экстракция РНК высокого качества из его тканей. Нами впервые выполнено сравнение эффективности трёх методов экстракции РНК из листьев растений карто-

феля в соответствии с рекомендациями MIQE [9] и с целью дальнейшего проведения ПЦР РВ.

Материалы и методики исследования

В основе исследования лежали наиболее распространённые методы экстракции РНК из листьев растений: с использованием (1) додецилсульфата натрия (SDS) и хлорида лития [13, 29], (2) коммерческого набора RNeasy® Plant Mini Kit [30] и (3) фенола с гуанидинтиоционатом в составе реагента TRIzol™ [11, 12].

Методы экстракции РНК оценены с точки зрения количественного выхода препарата, качества получаемых нуклеиновых кислот и присутствия в образцах ингибиторов ПЦР. Выявление качества РНК и ее количественного выхода проведено с помощью спектрофотометрических критериев, электрофоретического анализа и ПЦР в реальном времени.

Исследования проведены на двухнедельных растениях *Solanum tuberosum* L. среднеспелого сорта Луговской (идентификатор 8301891). Ткань листа измельчали в жидком азоте, после чего тотальную РНК экстрагировали тремя методами.

Первый метод описан Manickavelu et al. [13] и представлен в модификации Zlobin et al. [29] (далее метод Manickavelu et al.). Ткань листа (0,2 г) переносили в пробирку и добавляли 800 мкл экстракционного буфера (0,1 M Tris-HCl (pH 9,0), 0,1 M LiCl, 1 мМ ЭДТА (pH 8,0), 1% SDS), перемешивали на центрифуге-вортексе Микроспин («BioSan», Латвия) в течение 1 мин, а затем инкубировали 10 мин при комнатной температуре, периодически перемешивая. Затем добавляли 600 мкл смеси фенол-хлороформ-изоамиловый спирт (ФХИ) в соотношении 25:24:1, перемешивали и инкубировали непродолжительное время при комнатной температуре. Пробы центрифугировали 10 мин при 15 000 g (4 °C) («Eppendorf», Германия). Надосадочную жидкость (450 мкл) переносили в новую пробирку и добавляли равный объем ФХИ, после чего смесь перемешивали и центрифугировали 15 000 g (4 °C). Супернатант (450 мкл) переносили в чистую пробирку и добавляли 45 мкл 3M NaOAc и 1 350 мкл 100% этанола, после чего полученный раствор выдерживали 3 ч при –20 °C.

Образцы центрифугировали 20 мин при 15 000 g (4 °C), к осадку добавляли 1 мл 75% этанола и инкубировали в течение 20 мин при –20 °C. После этого центрифугировали 5 мин 7 000 g (4 °C). Осадок, содержащий РНК, подсушивали на льду. Затем осадок растворяли в 45 мкл воды, центрифугировали 15 мин 15 000 g (4 °C), отбирали 40 мкл супернатанта и переносили его в новую пробирку, в которую добавляли 11 мкл 3 M NaOAc и 100 мкл 80% этанола, инкубировали 45 мин и центрифугировали 15 мин 15 000 g (4 °C). Промывали осадок 1 мл 80% этанола, центрифугировали 5 мин 7 000 g (4 °C). Подсушивали осадок при 4 °C и растворяли его в воде.

Модификации метода [29] заключались в (1) последовательности добавления фенол-хлороформа и экстракционного буфера к растительному образцу (в методе Manickavelu et al., растения напрямую подвергались лизирующему действию фенол-хлороформа); (2) изменении температурного режима на этапе осаждения РНК, с –80 °С на –20 °С и увеличении продолжительности этапа с одного часа до трёх; (3) исключении стадии добавления LiCl к осаждённой РНК; (4) добавлен этап дополнительной очистки РНК после её экстракции, позволяющий снизить содержание нерастворимых примесей. Продолжительность экстракции данным методом составляет около 6 ч для 1–6 проб.

Второй анализируемый метод основан на применении коммерческого набора RNeasy® Plant Mini Kit [30] фирмы Qiagen (Германия). К растертой растительной ткани (0,1 г) добавляли 450 мкл экстракционного буфера (RLT или RLC) и тщательно перемешивали. Пробу переносили на колонку QIAshredder spin, центрифугировали 2 мин 15 000 g (4 °С). Надосадочную жидкость переносили в новую пробирку и добавляли 96% этанола объемом в два раза меньшим, чем объем супернатанта, и затем пипетировали. Пробу аккуратно помещали в колонку RNeasy Mini spin, центрифугировали 15 с 8 000 g. Колонку сначала промывали 700 мкл буфера RW1, потом дважды 500 мкл буфера RPE; в ходе каждого промывания колонку центрифугировали 15 с, 15 с и 2 мин соответственно при 8 000 g. Колонку переносили в чистую пробирку на 2 мл и центрифугировали 1 мин 15 000 g (4 °С). Связанную с мембранной РНК элюировали 1 мин 8 000 g. Данный метод позволяет получать готовый продукт РНК за 30 мин, возможна одновременная экстракция большого количества проб, ограниченного вместимостью центрифуги.

Третий метод (далее – TRIzol™) основан на реакции фенола с гуанидинтиоционатом, состав буфера предложен Chomczynski и Sacchi [17], методические рекомендации приведены в следующей ссылке [18]. Для экстракции РНК с использованием реагента TRIzol™ навеску растительной ткани (0,2 г), переносили в пробирку и добавляли 0,5 мл буфера (38% фенол, водный 0,8 М гуанидинтиоционат, водный 0,4 М аммонийтиоционат, водный 0,1 М ацетат натрия (pH 5), 5% глицерин). Перемешивали на центрифуге-вортексе Микроспин («BioSan», Латвия) и добавляли повторно 0,5 мл реагента. Инкубировали при комнатной температуре 10 мин. Добавляли 0,2 мл смеси хлороформа и изоамилового спирта в соотношении 24:1, перемешивали и инкубировали 2–3 мин. Центрифугировали 15 мин 12 000 g (4 °С). После разделения фракций верхнюю прозрачную фазу (~500 мкл) переносили в чистую пробирку, добавляли 50 мкл 3 М NaOAc и 500 мкл охлажденного изопропанола. Инкубировали 20 мин при –20 °С. После этого содержимое пробирки аккуратно перемешивали и центрифугировали 10 мин 12 000 g (4 °С). Осадок (РНК) промывали 75% этанолом. Центрифугировали 5 мин 7 500 g (4 °С). Данную процедуру повторяли дважды. Подсушивали РНК при 4 °С. Осадок растворяли водой. Для одновременной экстракции РНК (до 12 проб) данным методом требуется не менее 1,5 ч.

Концентрацию РНК и примесей (белков, полисахаридов) оценивали при помощи спектрофотометра («Implen», Германия) при длинах волн 230, 260 и 280 нм.

Электрофоретическое разделение экстрагируемых нуклеиновых кислот проводили в 1,5% агарозном геле на основе TBE буфера (Tris base, борная кислота, ЭДТА, pH 8,0) с добавлением 2,5 мкл бромистого этидия (10 мг/мл). В лунки вносили разбавленный в 5 раз раствор РНК (суммарно 10 мкл) и 2 мкл окрашивающего буфера (6X DNA Loading dye «Fermentas», Латвия).

Для предотвращения контаминации образцов РНК геномной ДНК пробы обработаны DNase I, RNase-free («Thermo Fisher Scientific», США). Реакция проведена согласно протоколу производителя: 2 мкл пробы РНК (2 мкг), 2 мкл ДНКазы, 2 мкл буфера, смесь доводили до объема 20 мкл водой и инкубировали 30 мин при 37 °С, после чего добавляли 2 мкл 25 мМ ЭДТА и инкубировали 10 мин при 65 °С. Синтез кДНК проведен с использованием наборов реактивов MMLV RT kit («Евроген», Россия) при помощи праймера Oligo$(dT)_{18}$. В пробирку вносили 5,5 мкл РНК, ранее очищенной ДНКазой, 1 мкл праймера Oligo$(dT)_{18}$ в концентрации 20 мкМ, перемешивали и осаждали на центрифуге-вортексе Микроспин («BioSan», Латвия). Инкубировали 2 мин при 70 °С, охлаждали в термостате («Biosan», Латвия) и осаждали конденсат. Добавляли 11 мкл смеси, состоящей из 4 мкл 5х буфера для обратной транскриптазы, 2 мкл dNTP (10 мМ каждого), 2 мкл DTT (20 мМ), и 2 мкл обратной транскриптазы MMLV (100 ед./мкл). Смесь перемешивали и инкубировали 60 мин при 42 °С; реакции синтеза останавливали нагреванием при 70 °С в течение 10 мин.

Для проведения ПЦР в реальном времени использовали праймеры для гена пролиндегидрогеназы, характеризующегося относительно высоким уровнем экспрессии в стандартных условиях. Транскрипт данного гена имеет сравнительно небольшой размер – 2 000 п.н. Нуклеотидную последовательность гена деградации пролина PDH получали из базы данных NCBI (The National Center for Biotechnology Information, USA). Специфические праймеры (F (5`–3`) – ATAACTGCAATTTGTACACCA; R (5`–3`) – GGCGAAAAGTGGAAGCG) конструировали в программе Vector NTI 11 (Invitrogen, США), специфичность оценивали на веб-платформе Primer-BLAST [31].

Оценка уровней транскриптов генов проведена методом полимеразной цепной реакции в реальном времени после обратной транскрипции на ПЦР-амплификаторе LightCycler`96 («Roche», Швейцария). Реакционная смесь объёмом 20 мкл содержала 4 мкл qPCRmix HS SYBR («Евроген», Россия), матрицу кДНК (4 мкл) предположительной концентрации 1, 10 и 100 нг в расчёте на одну реакцию; 0,3 мкМ прямого и обратного праймера. В качестве отрицательного контроля вместо матрицы кДНК использовали воду, положительного – ДНК.

Экстрагирование РНК каждым из 3 анализируемых методов проведено в 2–4 повторностях на двух группах растений картофеля, состоящих не менее,

чем из 3 листьев среднего яруса. ПЦР-РВ проведено в трехкратной аналитической повторности для каждого из разведений: исходная концентрация кДНК (100 нг), разведенная в десять и сто раз соответственно.

Сравнение методов основывали на показателях качества препарата и количества экстрагируемой РНК; ПЦР в реальном времени (метод десятикратных разведений) использовали для выявления в препаратах РНК ингибиторов реакции, в качестве которых могут выступать различные полисахариды, металлы и РНКазы.

Результаты исследования и обсуждение

Нами оценены три метода экстракции РНК, первый основан на способности SDS и хлорида лития ингибировать активность РНКазы, второй – на взаимодействии НК с диоксидом кремния в коммерческих колонках (Qiagen, Германия), третий – с применением реагента TRIzol™ (Invitrogen, США), в котором сильный окислитель гуанидитиоционат совместно с фенолом в составе буфера выступают как лизирующий агент и ингибитор РНКаз. Известно, что фенол дополнительно ингибирует нуклеазы и упрощает депротеинизацию нуклеиновых кислот, но вместе с тем создает с НК устойчивые фенол-хиноновые комплексы, которые выпадают в осадок на этапе осаждения РНК [32, 33] и тем самым снижают ее общий выход.

Анализируемые нами методы, прежде всего, отличаются продолжительностью экстракции РНК и применяемыми реагентами. Например, в первом методе из-за повторения этапов отмывания образца от солей хлорида лития этанолом и изопропанолом значительно увеличивается продолжительность экстракции; для удаления белков используется фенол-хлороформная смесь. Во втором методе для экстракции РНК использовали колонки (QIAshredder spin, RNeasy Mini spin, Qiagen, Германия). Данный метод является самым малозатратным по времени и исключает самостоятельное приготовление реактивов, что снижает риск загрязнения материала рибонуклеазами.

Третий метод экстракции РНК с реагентом TRIzol™ основывается на применении фенола, среди компонентов буфера присутствуют также гуанидинтиоционат и аммонийтиоционат, которые являются сильными окислителями и ингибируют внутриклеточные и внеклеточные РНКазы. Данная методика характеризуется средней продолжительностью экстракции.

Распространённые критерии качества РНК заключаются в оценке нуклеиновых кислот методом электрофореза в агарозном геле. О высоком качестве препарата свидетельствует присутствие трех выраженных полос. Для эукариотической РНК верхняя полоса представляет собой большую рибосомальную РНК 28S/25S (рРНК) длиной около 4,8 т.п.н.; средняя полоса является 18S рРНК (около 2,0 т.п.н.) и третья полоса – 5,8S (154 н.) и 5S (117 н.) РНК. Транспортные РНК (73–93 н.) могут визуально и не обнаруживаться. Наличие в геле нечётких полос или отношение интенсивности полос

28S:18S меньше 2:1 указывают на низкое качество выделенного препарата РНК [34].

Отсутствие визуального преобладания полосы рибосомальной 25S/28S РНК над 18S для препаратов РНК, экстрагированных первым методом (Manickavelu et al.), а также для одной из проб, полученной с помощью колонок RNeasy, свидетельствуют о низком качестве РНК (рис. 1). В то же время первый метод после проведения электрофореза позволил обнаружить на геле отдельные полосы, которые по своему размеру предположительно соответствуют тРНК, что, возможно, свидетельствует о щадящем воздействии реактивов на препарат РНК или о проведении более полной экстракции. К недостаткам первого метода относится высокое загрязнение РНК геномной ДНК, которая впоследствии разрушалась на этапе ДНКазирования. Опираясь на соотношение 28S:18S, можно предположить, что третий метод способствовал экстрагированию наиболее качественной РНК. Об этом свидетельствует и чёткое разграничение на агарозном геле трех типов рРНК (28S,18S и 5S), что характерно также и для препарата, полученного набором RNeasy® Plant Mini Kit.

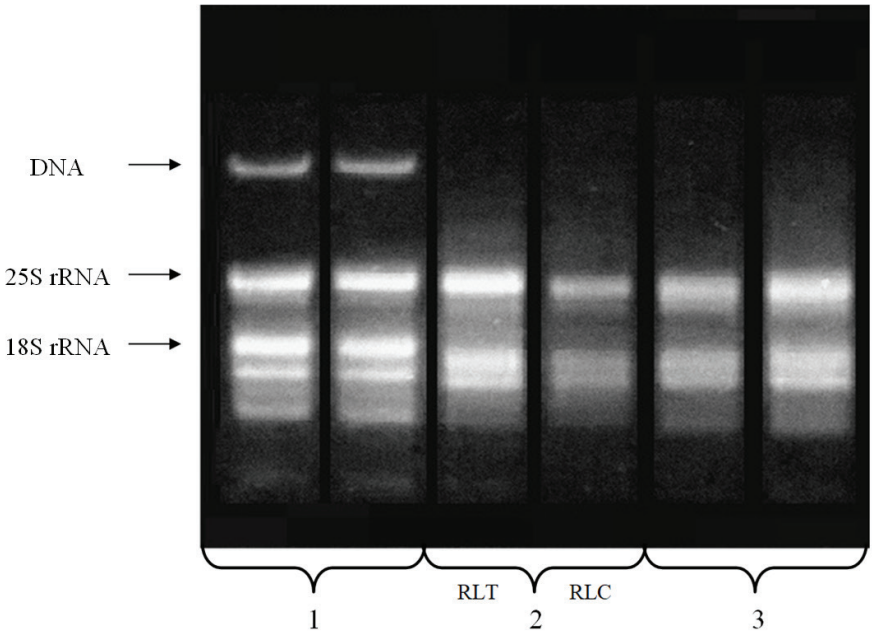

Рис. 1. Электрофорез нуклеиновых кислот в 1,5% агарозном геле: *1* – РНК, экстрагированная согласно методу Manickavelu et al.; *2* – РНК, экстрагированная с использованием RNeasy® Plant Mini Kit (экстракционный буфер RLT или RLC); *3* – РНК, экстрагированная реагентом TRIzol™
[**Fig. 1.** Nucleic acid electrophoresis in 1.5 % agarose gel: 1 - RNA extracted by Manickavelu et al. method; 2 - RNA extracted by RNeasy® Plant Mini Kit (extraction buffer RLT or RLC); 3 - RNA extracted by TRIzol™ reagent]

Дополнительный фактор, влияющий на целостность РНК, – наличие контаминации образца рибонуклеазами. РНКазы активируются при разрушении клеток, их ингибирование возможно низкими отрицательными температурами [22]. Для обнаружения примесей белков и полисахаридов в образце РНК используют спектрофотометрические характеристики – поглощение раствора РНК при 230, 260 и 280 нм [35, 36].

Количество РНК и степень её загрязнения (табл. 1) оценивали с помощью спектрофотометра Implen 300 (Германия). В качестве контроля использовали очищенную от РНКаз воду.

Таблица 1 [Table 1]

Концентрации препаратов РНК и оценка качества
[Concentration and quality of RNA]

Методы [Methods]		Концентрация РНК, нг/мкл [Concentration of RNA, ng / µl]	Спектрофотометрические показатели качества РНК [Spectrophotometric quality indicators of RNA]		Общий выход РНК, мкг [The total yield of RNA, mcg]
			$A_{260/280}$ *	$A_{260/230}$ *	
Manickavelu et al.		2 076	1,970	2,307	41,52
		2 332	1,950	2,327	46,66
RNeasy® Plant Mini Kit	RLT	1 980	2,089	1,725	49,50
	RLC	750	2,083	2,404	18,75
TRIzol™		1 344	1,931	1,626	80,64
		1 720	1,955	1,614	103,20
		1 482	1,966	1,843	88,92
		1 436	1,935	1,693	86,16

* – Очищенная РНК имеет величины: $A_{260/280} \approx 1,7–2,0$; $A_{260/230} \approx 2,0–2,2$.
[* - Expected values for pure RNA is $A_{260/280} \approx 1.7-2$; $A_{260/230} \approx 2.0-2.2$].

Значения соотношений $A_{260//280}$ и $A_{260/230}$ отражают состав полученного образца РНК. Соотношение $A_{260/280}$ свидетельствует о степени загрязнения пробы белками, соотношение $A_{260/230}$ – полисахаридами. Белки и полисахариды, связываясь с РНК, осаждают её, уменьшая общий выход РНК и ингибируя прохождение полимеразной цепной реакции (ПЦР) [32, 33]. Анализ соотношений $A_{260/280}$ и $A_{260/230}$ показывает, что меньше всего белков и полисахаридов содержат препараты РНК, экстрагируемые первым методом; высокая степень загрязнения белками и полисахаридами характерна для образцов РНК, экстрагированных третьим методом. В связи с этим можно отметить преимущество первого метода – отсутствие непосредственного контакта фенола с растительным материалом, что позволяет повысить качественный выход продукта. Количественная оценка показала, что наибольший выход РНК получен при использовании реагента TRIzol™.

Следующий способ оценки качества РНК – проведение количественной ПЦР с кДНК в различных кратностях разбавления [38]. Степень ингибирования ПЦР показана на графиках (рис. 2), значения пороговых циклов представлены в табл. 2.

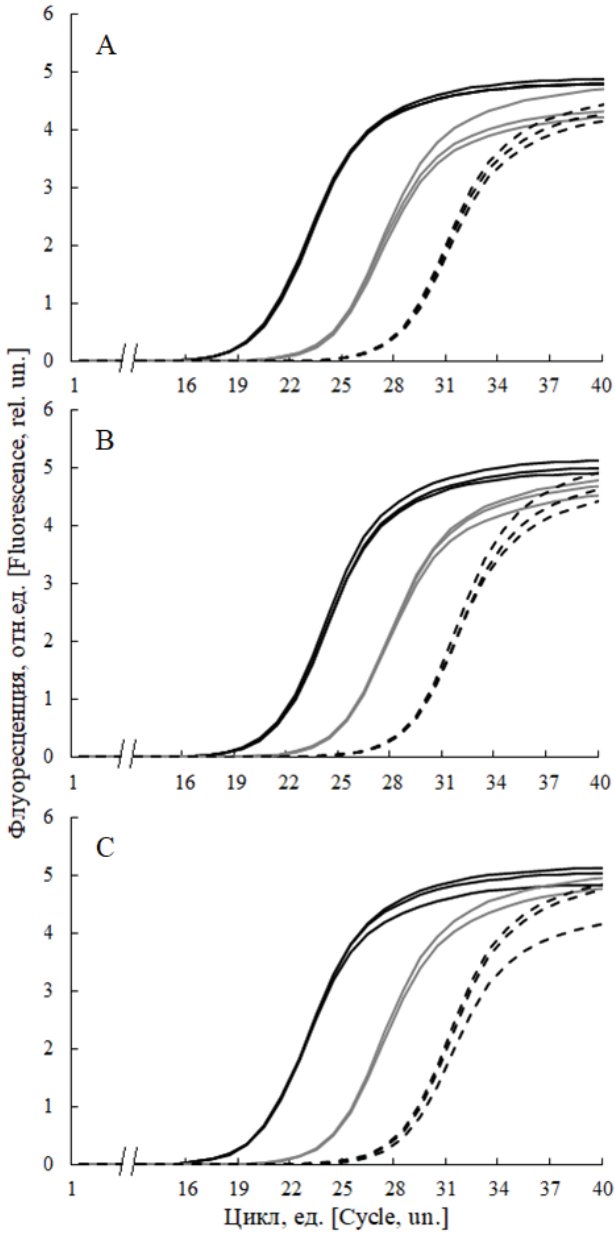

Рис. 2. Кривая флуоресценции: *A* – метод Manickavelu et al.; *B* – RNeasy® Plant Mini Kit (RLT); *C* – реагент TRIzol™; чёрной линией обозначена цельная концентрация; пунктирной – разведение в 10 раз; серой – разведение в 100 раз [**Fig. 2.** Fluorescence curve: A - method of Manickavelu et al.; B - RNeasy® Plant Mini Kit (RLT); C - TRIzol™ reagent; the black line indicates the native concentration; dashed line is 10-fold dilution; gray line is 100-fold dilution]

Точка подъёма кривой флуоресценции от оси X является началом стадии экспоненциального роста, данное значение на оси абсцисс называют пороговым циклом (Cq); ось ординат отображает уровень флуоресценции, превышающий фоновую для данного прибора и отображающий накопление двухцепочечных структур (N). Начальное количество матрицы (N_0) соответствовало цельной концентрации, для которой определены Cq_1, значения порогового цикла для кДНК и при разбавлении в 10 (Cq_2) и 100 (Cq_3) раз представлены ниже (см. табл. 2).

$$N = N_0 \times 2^{Cq}. \quad (1)$$

Деление N_0 на 10 соответствует разведению концентрации, следовательно, N_0 необходимо умножить на 10 или на 2 в степени 3,3:

$$N = \frac{N_0}{10} \times 2^{Cq+3,3}. \quad (2)$$

Основываясь на теоретических расчётах, разведение начальной концентрации матрицы кДНК в 10 раз приводит к смещению порогового цикла в норме на 3,3. Наши эмпирические данные (разница (Δ) между пороговыми циклами) продемонстрированы в табл. 2.

Таблица 2 [Table 2]

Влияние кратности разведения на величину порогового цикла амплификации
[The effect of multiple dilutions on quantitative cycle value]

Методы [Methods]	Cq_1	Cq_2	Cq_3	Разница (Δ) между пороговыми циклами [The difference (Δ) between quantification cycles]	
				$\Delta_{Cq1-Cq2}$	$\Delta_{Cq2-Cq3}$
Manickavelu et al.	18,29±0,05	22,61±0,1	26,43±0,08	4,32	3,82
RNeasy® Plant Mini Kit	19,43±0,09	23,21±0,03	27,06±0,07	3,78	3,85
Trizol™	18,18±0,02	22,58±0,05	26,34±0,11	4,4	3,76

Примечание. Пороговый или количественный цикл обозначается Cq или Ct. Индексы указывают на степень разведения кДНК: (1) – без разведения, (2) – 10-кратное, (3) – 100-кратное.

[*Note.* Threshold or quantification cycle is denoted by Cq or Ct. Indexes indicate the degree of cDNA dilution: (1) - without dilution, (2) - 10-fold, (3) - 100-fold].

Отклонение в различии между пороговыми циклами от значения 3,3 свидетельствует о нарушении прохождения ПЦР и, следовательно, присутствии дополнительных соединений, влияющих на протекание реакции. Чем выше концентрация кДНК, используемая в ПЦР, тем больше ингибитора присутствует в реакционной смеси, поэтому при последующих разведениях подавление полимеразной цепной реакции снижалось.

Различия между пороговыми циклами для препарата РНК, полученного коммерческим набором RNeasy® Plant Mini Kit, в меньшей степени отклоня-

лись от значения 3,3 при разведении кДНК, следовательно, экстрагируемая РНК имела меньше примесей в растворе. Образцы, полученные двумя другими методами, характеризовались значительным отклонением от $\Delta_{Cq1-Cq2}$, что свидетельствует о присутствии в образцах остатков реагентов – фенола или солей.

Таким образом, метод Manickavelu et al. позволяет получить препарат РНК из растений картофеля с самой высокой степенью чистоты (по соотношениям $A_{260/280}$ и $A_{260/230}$), но относительно низким количественным выходом (в среднем 220 мкг из 1 г растительной ткани). Применение реагента TRIzol™ способствовало экстракции большого количества РНК (в среднем, 450 мкг из 1 г растительной ткани), однако значительно уступало по степени очистки другими методами. Качество и количество нуклеиновой кислоты, экстрагируемой коммерческим набором RNeasy® Plant Mini Kit, определялось используемым буфером (RLT или RLC), средний выход РНК из 1 г растительной ткани составлял 340 мкг.

Заключение

Проведено сравнение эффективности экстракции РНК из листьев картофеля тремя методами, основываясь на качественных и количественных характеристиках полученного препарата НК. Методы, требующие самостоятельного приготовления реактивов, отличались времязатратностью и значительным риском контаминации, но являлись экономически эффективными. Показано, что применение метода с использованием реагента TRIzol™ нуждается в дополнительных способах очистки РНК от примесей, которые изменяют соотношения $A_{260/280}$ и $A_{260/230}$ для препарата РНК и негативно влияют на протекание ПЦР РВ. Использование колонок коммерческого набора RNeasy® Plant Mini Kit значительно сокращает время экстракции РНК и способствует наиболее оптимальному протеканию реакции амплификации, однако не подходит для экстракции короткоразмерных мРНК. Производитель Qiagen предусмотрел отдельные наборы для экстракции РНК длиной менее 200 нуклеотидов, например MiRNeasy Mini Kit. Метод, описанный Manickavelu et al., с модификациями, несмотря на его продолжительность, позволяет снизить степень загрязнения препарата РНК белками и полисахаридами, а также визуализировать малые РНК в агарозном геле, что свидетельствует о щадящем воздействии реактивов на препарат РНК, позволяющем сохранить целостность молекул, или об осуществлении более полной экстракции. Однако для данного метода требуется дополнительная очистка от составляющих буфера и / или других реагентов, участвующих в экстракции, чтобы исключить ингибирование ПЦР РВ.

Литература

1. Morange M. A new revolution? The place of systems biology and synthetic biology in the history of biology // The European Molecular Biology Organization reports. 2010. № 10. PP. S50–S53. doi: 10.1038 / embor.2009.156

2. ПЦР в реальном времени / Д.В. Ребриков, Г.А. Саматов, Д.Ю. Трофимов, П.А. Семенов, А.М. Савилова, И.А. Кофиади, Д.Д. Абрамов ; под ред. Д.В. Ребрикова. 3-е изд. М. : Бином. Лаборатория знаний, 2011. 223 с.
3. Wallace D.M. Precipitation of nucleic acids // Methods in enzymology. 1987. № 152. PP. 41–48. doi: 10.1016/0076-6879(87)52008-0
4. Swift G.H., Peyton M.J., MacDonald R.J. Assessment of RNA quality by semi-quantitative RT-PCR of multiple regions of a long ubiquitous mRNA // Biotechniques. 2000. № 28(3). PP. 524–531. doi: 10.2144/00283rr01
5. Imbeaud S., Graudens E., Boulanger V., Barlet X., Zaborski P., Eveno E., Mueller O., Schroeder A., Auffray C. Towards standardization of RNA quality assessment using user–independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces // Nucleic acids research. 2005. № 33(6). PP. e56–e56. doi: 10.1093/nar/gni054
6. Simone F., Michael W.P. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance // Molecular Aspects of Medicine. 2006. № 27(2–3). PP. 126–139. doi: 10.1016/j.mam.2005.12.003
7. Pérez-Novo C.A., Claeys C., Speleman F., Van Cauwenberge P., Bachert C., Vandesompele J. Impact of RNA quality on reference gene expression stability // Biotechniques. 2005. № 39 (1). PP. 52–56. doi: 10.2144/05391BM05
8. Bustin S., Nolan T. Talking the talk, but not walking the walk: RT-qPCR as a paradigm for the lack of reproducibility in molecular // European Journal of Clinical Investigation. 2017. № 10 (47). PP. 756–774. doi: 10.1111/eci.12801
9. Bustin S., Benes V., Garson J., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M., Shipley G., Vandesompele J., Wittwer C. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR Experiments // Clinical Chemistry. 2009. № 55 (4). PP. 611–622. doi: 10.1373/clinchem.2008.112797
10. Schrader C., Schielke A., Ellerbroek L., Johne R. PCR inhibitors – occurrence, properties and removal // J. Appl Microbiol. 2012. №113. PP. 1014–1026. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x
11. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction // Anal Biochem. 1987. № 162(1). PP. 156–159. doi: 10.1016/0003-2697(87)90021-2
12. TRIzol™ reagent user guide. In: *Thermo Fisher Scientific*. URL: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/trizol_reagent.pdf (accessed: 16.03.2020).
13. Manickavelu A., Kambara K., Mishina K., Koba T. An efficient method for purifying high quality RNA from wheat pistils // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2007. № 54. PP. 254–258. doi: 10.1016/j.colsurfb.2006.10.024
14. Mazzara M., James D.J. The influence of photoperiodic growth condition on isolation of RNA from strawberry (*Fragaria* × *ananassa duch*.) tissue // Mol Biotechnol. 2000. № 15. PP. 237–241. doi: 10.1385/MB:15:3:237
15. Liu L., Han R., Yu N., Zhang W., Xing L., Xie D., Peng D. A method for extracting high-quality total RNA from plant rich in polysaccharides and polyphenols using *Dendrobium huoshanense* // PLoS ONE. 2018. № 13(5). P. e0196592. doi: 10.1371/journal.pone.0196592
16. Yaffe H., Buxdorf K., Shapira I., Ein-Gedi S., Zvi M.M.-B., Fridman E., Moshelion M., Levy M. LogSpin: a simple, economical and fast method for RNA isolation from infected or healthy plants and other eukaryotic tissues // BMC research notes. 2012. № 5. P. 45. doi: 10.1186/1756-0500-5-45
17. Yang Y., Moore M.J., Brockington S.F., Timoneda A., Feng T., Marx H.E., Walker J.F., Smith S.A. An efficient field and laboratory workflow for plant phylotranscriptomic projects // Applications in plant sciences. 2017. № 5 (3). P. 1600128. doi: 10.3732/apps.1600128
18. Pearson J.D., Trcka D., Hyduk S.J., Aynaud M.-M., Hernández J.J., Peidis F., Lu S., Chan K., Woodgett J., Mazzulli T., Attisano L., Pelletier L., Cybulsky M.I., Wrana J.L.,

Bremner R. Comparison of SARS-CoV-2 indirect and direct detection methods // BioRxiv. 2020. Preprint. doi:10.1101/2020.05.12.092387
19. Pritchard C., Cheng H., Tewari M. MicroRNA profiling: approaches and considerations // Nature Reviews Genetics. 2012. № 13. PP. 358–369. doi: 10.1038/nrg3198
20. Castoldi M., Benes V., Hentze M.W., Muckenthaler M.U. MiChip: a microarray platform for expression profiling of microRNAs based on locked nucleic acid (LNA) oligonucleotide capture probes // Methods. 2007. № 43 (2). PP. 146–152. doi: 10.1016/j.ymeth.2007.04.009
21. Podolska A., Kaczkowski B., Litman T., Fredholm M., Cirera S. How the RNA isolation method can affect microRNA microarray results // Acta Biochimica Polonica. 2011. № 58 (4). PP. 535–540. doi:_10.18388/abp.2011_2221
22. Accerbi M., Schmidt S.A., De Paoli E., Park S., Jeong D.H., Green P.J. Methods for isolation of total RNA to recover miRNAs and other small RNAs from diverse species // Methods in Molecular Biology. 2010. № 592. PP. 31–50. doi: 10.1007/978-1-60327-005-2_3
23. Häntzsch M., Tolios A., Beutner F., Nagel D., Thiery J., Teupser D., Holdt L.M. Comparison of whole blood RNA preservation tubes and novel generation RNA extraction kits for analysis of mRNA and MiRNA profiles // PLOS ONE. 2014. № 9 (12). P. e113298. doi: 10.1371/journal.pone.0113298
24. Luypaert G., Witters J., Van Huylenbroeck J., De Clercq P., De Riek J., De Keyser E. Induced expression of selected plant defence related genes in pot azalea, *Rhododendron simsii* hybrid // Euphytica. 2017. № 213(10). P. 227. doi: 10.1007/s10681-017-2010-5
25. Abdel-Latif A., Osman G. Comparison of three genomic DNA extraction methods to obtain high DNA quality from maize // Plant Methods. 2017. № 13(1). P. 1. doi: 10.1186/s13007-016-0152-4
26. Fasiludeen N., Narayanannair A., Appukuttannair G., Kalluvettankuzhy K.S. High-quality RNA extraction from small cardamom tissues rich in polysaccharides and polyphenols // Analytical Biochemistry. 2015. № 485. PP. 25–27. doi: 10.1016/j.ab.2015.05.017
27. Ranatunge I., Adikary S., Dasanayake P., Fernando C.D., Soysa P. Development of a rapid and simple method to remove polyphenols from plant extracts // International Journal of Analytical Chemistry. 2017. № 2017. PP. 1–7. doi: 10.1155/2017/7230145
28. Gupta P., Salava H., Sreelakshmi Y., Sharma R. A low-cost high-throughput method for plant genomic DNA isolation // Cereal Genomics. Methods in Molecular Biology. Humana, New York, 2020. Vol. 2072. PP. 1–7. doi: 10.1007/978-1-4939-9865-4_1
29. Zlobin I.E., Pashkovskiy P.P., Kartashov A.V., Nosov A.V., Fomenkov A.A., Kuznetsov V.V. The relationship between cellular Zn status and regulation of Zn homeostasis genes in plant cells // Environmental and Experimental Botany. 2020. Vol. 176. P. 104104. doi: 10.1016/j.envexpbot.2020.104104
30. Quick-Start Protocol RNeasy® Plant Mini Kit. In: QIAGEN. URL: https://www.qiagen.com/jp/ (accessed: 16.03.2020).
31. Primer-BLAST // NCBI. URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/ (accessed: 16.03.2020).
32. Shu C., Sun S., Chen J., Zhou E. Comparison of different methods for total RNA extraction from sclerotia of *Rhizoctonia solani* // Electronic Journal of Biotechnology. 2014. № 17. PP. 50–54. doi: 10.1016/j.ejbt.2013.12.009
33. Prasanta K.D. High quality RNA isolation from polyphenol-, polysaccharide- and protein-rich tissues of lentil (*Lens culinaris*) // 3 Biotech. 2013. № 3 (2). PP. 109–114. doi: 10.1007/s13205-013-0171-z
34. Aranda P.S., LaJoie D.M., Jorcyk C.L. Bleach gel: a simple agarose gel for analyzing RNA quality // Electrophoresis. 2012. № 33 (2). PP. 366–369. doi: 10.1002/elps.201100335
35. De Keyser E., Desmet L., Losschaert M., De Riek J. A General protocol for accurate gene expression analysis in plants // Quantitative Real-Time PCR. Methods in Molecular Biology. Humana, New York, 2020. Vol. 2065. doi: 10.1007/978-1-4939-9833-3_9

36. Japelaghi R.H., Haddad R., Garoosi G. Rapid and efficient isolation of high quality nucleic acids from plant tissues rich in polyphenols and polysaccharides // Mol Biotechnol. 2011. № 49. PP. 129–137. doi: 10.1007/s12033-011-9384-8
37. Die J.V., Román B. RNA quality assessment: a view from plant qPCR studies // Journal of Experimental Botany. 2012. № 63(17). PP. 6069–6077. doi: 10.1093/jxb/ers276
38. Wieczorek D., Delauriere L., Schagat T. Methods of RNA quality assessment. In: *Promega corporation web site*. URL: https://worldwide.promega.com/resources/pubhub/methods-of-rna-quality-assessment (accessed: 16.03.2020)

Поступила в редакцию 04.04.2020 г.; повторно 12.07.2020 г.; 14.08.2020 г. принята 19.08.2020 г.; опубликована 25.09.2020 г.

Авторский коллектив:
Мурган Ольга Константиновна – аспирант кафедры физиологии растений, биотехнологии и биоинформатики, Биологический институт, Национальный исследовательский Томский государственный университет (Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 36).
ORCID iD: https://orcid.org/0000-0001-7535-0441
E-mail: reborn_rinni@mail.ru
Казакова Анна Дмитриевна – студентка кафедры физиологии растений, биотехнологии и биоинформатики, Биологический институт, Национальный исследовательский Томский государственный университет (Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 36).
E-mail: a.kazakova99@mail.ru
Ефимова Марина Васильевна – канд. биол. наук, доцент кафедры физиологии растений, биотехнологии и биоинформатики, Биологический институт, Национальный исследовательский Томский государственный университет (Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 36).
E-mail: stevmv555@gmail.com
ORCID iD: https://orcid.org/0000-0001-9703-9304

Для цитирования: Мурган О.К., Казакова А.Д., Ефимова М.В. Сравнение методов экстракции РНК из растения картофеля для проведения ПЦР в реальном времени // Вестн. Том. гос. ун-та. Биология. 2020. № 51. С. 123–140. doi: 10.17223/19988591/51/7

For citation: Murgan OK, Kazakova AD, Efimova MV. Comparison of methods for RNA extraction from potato plants for real-time PCR. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*. 2020;51:123-140. doi: 10.17223/19988591/51/7 In Russian, English Summary

Olga K. Murgan, Anna D. Kazakova, Marina V. Efimova

Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation

Comparison of methods for RNA extraction from potato plants for real-time PCR

Molecular methods allow solving both fundamental and applied problems of biology. The use of these methods makes it possible to determine not only the systematic position of the organism, but also to reveal the differential expression of certain groups of genes in response to the action of regulatory factors. RNA extraction involves the following main stages: cell lysis (destruction), deproteinization and RNA purification. The main methods for their implementation were described in 1987, and in 2009 the minimum requirements for publishing the results of real-time PCR (RT-PCR) - MIQE (Minimum Information for publication of Quantitative real-time Experiments) were developed. There are requirements for RNA samples and DNA– allowable presence of protein and polysaccharide contaminants, concentration and integrity of the nucleic acid sample.

Nucleic acid extraction is a major step in molecular biology. Currently, a large number

of protocols and guidelines for the extraction of RNA and DNA from different groups of organisms are described. Among the methodological articles devoted to molecular research in the field of plant physiology, interest is mainly focused on methods for the extraction of total RNA using phenol in a buffer with a low pH value (for example, TRIzol ™ and Tri Reagent® reagents (Invitrogen, USA)), chloride lithium and / or sodium chloride, as well as silicon dioxide (including columns for centrifugation from companies such as Qiagen (Germany), Norgen Biotek (Canada) and Invitrogen (USA)).

The complexity due to extraction is directly determined by the general chemical composition of the plant. There are no universal methodological recommendations for each type of plant; therefore, researchers are forced to carry out comparative analysis of extraction methods based on their own research objects and, if necessary, carry out stage modifications aimed at improving the quality of the nucleic acid preparations released, since their purity depends on the correctness and reliability of the results of molecular studies and their practical applications. The high content of polysaccharides in plants complicates the isolation and purification of total RNA. Their excessive content in RNA disrupts the optimal real-time PCR and can lead to an erroneous assessment of the level of expression of target genes. There is a need to assess the quality of the obtained nucleic acid preparation for the test samples due to the low repeatability of the experiments. Regarding potato plants, there is currently no standard method for extracting nucleic acids. At the same time, potato, being one of the important objects of study, is characterized by a high content of polysaccharides, which complicates the extraction of high-quality RNA from potato tissues. In this connection, for the first time, we compared the effectiveness of the three methods of RNA extraction from the leaves of potato plants with the aim of subsequent real-time PCR in accordance with the recommendations of MIQE. The first method is based on the use of a surfactant - SDS and a monovalent metal salt - lithium chloride to inhibit the activity of Rnase. This method was described by Manickavelu et al. in 2007 and modified by a team of scientists from the Institute of Plant Physiology of the Russian Academy of Sciences in 2020. The second is based on the mechanism of binding nucleic acids with silica gel membrane in commercial columns RNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen, Germany) in the presence of chaotropic. The third is based on using the TRIzol ™ reagent in which phenol with a strong oxidizing agent - guanidine thiocyanate is included in the extraction buffer and act as a lysing agent and an RNase inhibitor.

To assess the quality of total RNA, the following was used: (1) agarose gel electrophoresis, which demonstrates the integrity of RNA; (2) measuring the concentration of RNA and evaluating the ratios ($A_{260/280}$ and $A_{260/230}$) with a spectrophotometer, which indicates the RNA yield and the degree of purification of the sample from proteins and polysaccharides; and (3) real-time PCR using the ten-fold dilution method to detect the presence of additional compounds in RNA samples that affect the functioning of the enzymes and as a consequence, the efficiency of the reaction.

In the process of choosing the method of RNA extraction, it is important to take into account not only the chemical composition of the reagents, but also the requirements for the method, such as the quantitative yield of the obtained RNA, duration of extraction, throughput, or quality of the final reaction product.

Methods requiring self-preparation of reagents, the first (Manickavelu et al.) and the third methods (using the TRIzol ™ reagent), were time consuming and had a significant risk of contamination, but were more cost effective. In addition, they were distinguished by the need to use phenol, which forms stable complexes with nucleic acids as a result of the oxidation reaction. These compounds can lead to darkening of the sample, reduce the total quantitative yield of RNA and inhibit key enzymes for real-time PCR.

During our research, we demonstrated that the use of the TRIzol™ reagent needs additional steps for RNA purifying from impurities, which negatively affects the ratios $A_{260/280}$ and $A_{260/230}$ for the RNA (*See Table 1*) and optimal real-time PCR (*See Table 2 and Fig. 2*). The use of the commercial RNeasy® Plant Mini Kit spin-columns significantly reduces the time of RNA extraction and contributes to the most optimal amplification reaction (*See Table 2 and Fig. 2*), but is not suitable for the extraction of short-sized mRNAs. The Manickavelu`s method, despite its duration, allows to reduce the degree of contamination of the RNA with proteins and polysaccharides (*See Table 1*), as well as visualizes small RNAs in an agarose gel (*See Fig. 1*), which indicates the sparing effect of the reagents on the RNA and allows to preserve the integrity of the molecules or a more complete extraction. However, this method requires additional purification from the components of the buffer and/or other reagents involved in the extraction in order to exclude inhibition of real-time PCR.

The paper contains 2 Figures, 2 Tables and 38 References.

Key words: *Solanum tuberosum* L.; RNA; phenol; electrophoresis; nanospectrophotometer; Real-time PCR.

Funding: This work was partially supported by the Russian Foundation for Basic Research (Grant No 20-34-90094).

References

1. Morange M. A new revolution? The place of systems biology and synthetic biology in the history of biology. *EMBO reports*. 2010;10:S50-S53. doi: 10.1038/embor.2009.156
2. Rebrikov DV, Samatov GA, Trofimov DYu, Semenov PA, Savilova AM, Kofiadi IA, Abramov DD. PTsR v real'nom vremeni [Real-time PCR. 3nd ed.]. Rebrikova DV, editor. Moscow: Binom. Laboratoriya znaniy Publ.; 2011. 223 p. In Russian
3. Wallace DM. Precipitation of nucleic acids. *Methods in Enzymology*. 1987;152:41-48. doi: 10.1016/0076-6879(87)52008-0
4. Swift GH, Peyton MJ, MacDonald RJ. Assessment of RNA quality by semi-quantitative RT-PCR of multiple regions of a long ubiquitous mRNA. *Biotechniques*. 2000;28(3):524-531. doi: 10.2144/00283rr01
5. Imbeaud S, Graudens E, Boulanger V, Barlet X, Zaborski P, Eveno E, Mueller O, Schroeder A, Auffray C. Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. *Nucleic Acids Research*. 2005;33(6):e56-e56. doi: 10.1093/nar/gni054
6. Simone F, Michael WP. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Molecular Aspects of Medicine*. 2006;27(2-3):126-139. doi: 10.1016/j.mam.2005.12.003
7. Pérez-Novo CA, Claeys C, Speleman F, Van Cauwenberge P, Bachert C, Vandesompele J. Impact of RNA quality on reference gene expression stability. *Biotechniques*. 2005;39(1):52-56. doi: 10.2144/05391BM05
8. Bustin S, Nolan T. Talking the talk, but not walking the walk: RT-qPCR as a paradigm for the lack of reproducibility in molecular. *Eur J Clin Invest*. 2017;10(47):756-774. doi: 10.1111/eci.12801
9. Bustin S, Benes V, Garson J, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl M, Shipley G, Vandesompele J, Wittwer C. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*. 2009;55(4):611-622. doi: 10.1373/clinchem.2008.112797
10. Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, Johne R. PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol.* 2012;113:1014-1026. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x

11. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162(1):156-159. doi: 10.1016/0003-2697(87)90021-2
12. *TRIzol™ reagent user guide.* In: *Thermo Fisher Scientific*. Available at: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/trizol_reagent.pdf (accessed 16.03.2020).
13. Manickavelu A, Kambara K, Mishina K, Koba T. An efficient method for purifying high quality RNA from wheat pistils. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2007;54:254-258. doi: 10.1016/j.colsurfb.2006.10.024
14. Mazzara, M, James, DJ. The influence of photoperiodic growth condition on isolation of RNA from strawberry (*Fragaria × ananassa duch.*) tissue. *Mol Biotechnol*. 2000;15:237-241. doi: 10.1385/MB:15:3:237
15. Liu L, Han R, Yu N, Zhang W, Xing L, Xie D, Peng D. A method for extracting high-quality total RNA from plant rich in polysaccharides and polyphenols using *Dendrobium Huoshanense. PLoS ONE*. 2018;13(5):e0196592. doi: 10.1371/journal.pone.0196592
16. Yaffe H, Buxdorf K, Shapira I, Ein-Gedi S, Zvi MMB, Fridman E, Moshelion M, Levy M. LogSpin: A simple, economical and fast method for RNA isolation from infected or healthy plants and other eukaryotic tissues. *BMC Research Notes.* 2012;5:45. doi: 10.1186/1756-0500-5-45
17. Yang Y, Moore MJ, Brockington SF, Timoneda A, Feng T, Marx HE, Walker JF, Smith SA. An efficient field and laboratory workflow for plant phylotranscriptomic projects. *Applications in Plant Sciences*. 2017;5(3):1600128. doi: 10.3732/apps.1600128
18. Pearson JD, Trcka D, Hyduk SJ, Aynaud MM, Hernández JJ, Peidis F, Lu S, Chan K, Woodgett J, Mazzulli T, Attisano L, Pelletier L, Cybulsky MI, Wrana JL, Bremner R. Comparison of SARS-CoV-2 indirect and direct detection methods. *BioRxiv*. 2020;Preprint. doi: 10.1101/2020.05.12.092387
19. Pritchard C, Cheng H, Tewari M. MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nat Rev Genet*. 2012;13:358-369. doi: 10.1038/nrg3198
20. Castoldi M, Benes V, Hentze MW, Muckenthaler MU. MiChip: A microarray platform for expression profiling of microRNAs based on locked nucleic acid (LNA) oligonucleotide capture probes. *Methods*. 2007;43(2):146-152. doi: 10.1016/j.ymeth.2007.04.009
21. Podolska A, Kaczkowski B, Litman T, Fredholm M, Cirera S. How the RNA isolation method can affect microRNA microarray results. *Acta Biochimica Polonica*. 2011;58(4):535-540. doi: 10.18388/abp.2011_2221
22. Accerbi M, Schmidt SA, De Paoli E, Park S, Jeong DH, Green PJ. Methods for isolation of total RNA to recover miRNAs and other small RNAs from diverse species. *Methods in Molecular Biology*. 2010;592:31-50. doi: 10.1007/978-1-60327-005-2_3
23. Häntzsch M, Tolios A, Beutner F, Nagel D, Thiery J, Teupser D, Holdt LM. Comparison of whole blood RNA preservation tubes and novel generation RNA extraction kits for analysis of mRNA and MiRNA profiles. *PLOS ONE.* 2014;9(12):e113298. doi: 10.1371/journal.pone.0113298
24. Luypaert G, Witters J, Van Huylenbroeck J, De Clercq P, De Riek J, De Keyser E. Induced expression of selected plant defence related genes in pot azalea, *Rhododendron simsii* hybrid. *Euphytica*. 2017;213(10):227. doi: 10.1007/s10681-017-2010-5
25. Abdel-Latif A, Osman G. Comparison of three genomic DNA extraction methods to obtain high DNA quality from maize. *Plant Methods*. 2017;13(1):1. doi: 10.1186/s13007-016-0152-4
26. Fasiludeen N, Narayanannair A, Appukuttannair G, Kalluvettankuzhy KS. High-quality RNA extraction from small cardamom tissues rich in polysaccharides and polyphenols. *Analytical Biochemistry.* 2015;485:25-27. doi: 10.1016/j.ab.2015.05.017
27. Ranatunge I, Adikary S, Dasanayake P, Fernando CD, Soysa P. Development of a rapid and simple method to remove polyphenols from plant extracts. *Analytical Chemistry*. 2017;2017:1-7. doi: 10.1155/2017/7230145

28. Gupta P, Salava H, Sreelakshmi Y, Sharma R. A Low-cost high-throughput method for plant genomic DNA isolation. In: *Cereal Genomics. Methods in Molecular Biology.* Vol. 2072. Vaschetto LM, editor. New York: Humana Publ.; 2020. pp. 1-7. doi: 10.1007/978-1-4939-9865-4_1
29. Zlobin IE, Pashkovskiy PP, Kartashov AV, Nosov AV, Fomenkov AA, Kuznetsov VV. The relationship between cellular Zn status and regulation of Zn homeostasis genes in plant cells. *Environmental and Experimental Botany*. 2020;176:104104. doi: 10.1016/j.envexpbot.2020.104104
30. *Quick-start protocol RNeasy® Plant Mini Kit.* In: *QIAGEN*. Available at: https://www.qiagen.com/jp/ (accessed 16.03.2020).
31. Primer-BLAST. In: *NCBI*. Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/ (accessed 16.03.2020).
32. Shu C, Sun S, Chen J, Zhou E. Comparison of different methods for total RNA extraction from sclerotia of *Rhizoctonia solani. Electron J Biotechnology*. 2014;17:50-54. doi: 10.1016/j.ejbt.2013.12.009
33. Prasanta KD. High quality RNA isolation from polyphenol-, polysaccharide- and protein-rich tissues of lentil (*Lens culinaris*). *3 Biotech*. 2013;3(2):109-114. doi: 10.1007/s13205-013-0171-z
34. Aranda PS, LaJoie DM, Jorcyk CL. Bleach gel: A simple agarose gel for analyzing RNA quality. *Electrophoresis*. 2012;33(2):366-369. doi: 10.1002/elps.201100335
35. De Keyser E, Desmet L, Losschaert M, De Riek J. A General protocol for accurate gene expression analysis in plants. In: *Quantitative Real-Time PCR. Methods in Molecular Biology.* Vol. 2065. Biassoni R and Raso A, editors. New York: Humana Publ.; 2020. pp. 105-118. doi: 10.1007/978-1-4939-9833-3_9
36. Japelaghi RH, Haddad R, Garoosi G. Rapid and efficient isolation of high quality nucleic acids from plant tissues rich in polyphenols and polysaccharides. *Mol Biotechnol.* 2011;49:129-137. doi: 10.1007/s12033-011-9384-8
37. Die JV, Román B. RNA quality assessment: a view from plant qPCR studies. *Experimental Botany*. 2012;63(17):6069-6077. doi: 10.1093/jxb/ers276
38. Wieczorek D, Delauriere L, Schagat T. Methods of RNA quality assessment. In: *Promega Corporation Web site*. Available at: https://worldwide.promega.com/resources/pubhub/methods-of-rna-quality-assessment (accessed 16.03.2020)

Received 04 April 2020; Revised 12 July 2020 and 14 August 2020; Accepted 19 August 2020; Published 25 September 2020

Author info:
Murgan Olga K, Post-graduate Student, Department of Plant Physiology, Biotechnology and Bioinformatics, Institute of Biology, Tomsk State University, 36 Lenin Ave., Tomsk 634050, Russian Federation.
ORCID iD: https://orcid.org/0000-0001-7535-0441
E-mail: reborn_rinni@mail.ru
Kazakova Anna D, Student, Department of Plant Physiology, Biotechnology and Bioinformatics, Institute of Biology, Tomsk State University, 36 Lenin Ave., Tomsk 634050, Russian Federation.
E-mail: a.kazakova99@mail.ru
Efimova Marina V, Cand. Sci. (Biol.), Assoc. Prof., Department of Plant Physiology, Biotechnology and Bioinformatics, Institute of Biology, Tomsk State University, 36 Lenin Ave., Tomsk 634050, Russian Federation.
ORCID iD: https://orcid.org/0000-0001-9703-9304
E-mail: stevmv555@gmail.com

,