ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТВАРИН НААН

Екстракція загальної РНК з мікросудинних ендотеліальних клітин головного мозку білих мишей

Л. Мінченг[1], О. І. Касяненко[2]

[1]Хенанський технологічний інститут, провінція Хенань, Китай

[2]Сумський НАУ, м. Суми, Україна

Вступ

Streptococcus suis 2 є новим зоонозним збудником, який етіологічним чинником менінгіту свиней. Патогенез менінгіту, викликаного *S. suis* (серотип 2), охоплює кілька етапів. Взаємодія між *S. suis* (серотип 2) і мікросудинними ендотеліальних клітин мозку є важливим етапом, який характеризується негативним впливом на гематоенцефалічний бар'єр та, відповідно, на центральну нервову систему (ЦНС). вивчення взаємодії між *S. suis* (серотип 2) та мікросудинними ендотеліальними клітинами мозку має велике значення дослідження патогенезу менінгіту.

Матеріали і методи

Попередньо ізольований патоген *Streptococcus suis* (серотип 2) в дозі 100 (MOI) інокулювали в лунки 6-лункового планшету з 2 см^3 суспензії розморожених і відновлених ендотеліальних клітин мікросудин головного мозку мишей. Дослід проводили у трьох повторностях. Через 12 год за допомогою *Trizol* методу з ендотеліальних клітин екстрагували загальну РНК за допомогою обладнання *TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extraction* (*Takara*, Японія). Процес звороньої транскрипції геному збудника досліджували за допомогою набору *PrimeScript RT Master Mix* (*Takara*, Японія). Зворотню транскрипцію здійснювали за допомогою ПЛР (*Biometra company*, Німеччина). Концентрація та чистота екстрагованої сумарна РНК досліджена за допомогою приладу *Nanodrop* (*Thermo company*, США).

Результати й обговорення

Середні показники концентрації РНК складали: 1 — 1183,0 мкг/мл; 2 — 1023,9 мкг/мл; 3 — 1213,3 мкг/мл; 4 — 1314,2 мкг/мл; 5 — 931,1 мкг/мл; 6 — 1273,5 мкг/мл відповідно. Чистота РНК (OD260/280): 1 — 1,82; 2 — 1,95; 3 — 1,86; 4 — 1,87; 5 — 1,93; 6 — 1,89. Чистота РНК (OD260/230): 1 — 2,18; 2 — 2,09; 3 — 2,12; 4 — 2,17; 5 — 2,18; 6 — 2,10 відповідно. РНК дуже нестабільна і легко руйнується специфічними. Слід зазначити, що в процесі експерименту важко було отримати високоякісну РНК. Цей процес потребує значних зусиль і кропіткої роботи, а саме: робоча зона повинна бути стерильною, піпетки, наконечники, тюбики, рукавички та маски повинні бути одноразовими, а маски та рукавички слід часто міняти. Значення OD260/280 для чистої РНК становить 2,0. Якщо коефіцієнт низький, це означає, що він забруднений білковими (ароматичними) або фенольними речовинами. Значення OD260/230 для чистої РНК становить 2,5. Якщо коефіцієнт менше 2,0, це свідчить про забруднення зразка вуглеводами та солями. Індикована РНК дуже нестабільна. Слід зазначити, що час протягом якого виконується зворотну транскрипція повинен бути мінімальним, а зберігання РНК доцільно здійснювати при низькій температурі. Результати проведених нами досліджень показали досить високі значення OD260/280 і OD260/230, що вказує на відсутність доказів щодо цілісності РНК. Для завершення досліджень результату цілісності РНК необхідно провести гель-електрофорез. При наявності 3 смуг для 5S РНК, 18S РНК і 28S РНК констатували руйнування індикованої РНК. У той же час, реєстрація чіткості двох смуг 18S РНК і 28S РНК констатувала про цілісність РНК.

Висновки

За результатами експериментальних досліджень доведено ефективність екстракції РНК методом *Trizol* з інфікованих ізолятами *S. suis* (серотип 2) ендотеліальних клітин мікросудин головного мозку білих мишей при MOI 100 протягом 12 годин. Отримана високоякісна РНК і зворотна транскрипція до стабільної ДНК для подальшого виявлення споріднених цитокінів. Запропонований метод виділення РНК забезпечує основу для подальшої роботи..