



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) **ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

(52) СПК

C12N 15/10 (2021.05)

(21)(22) Заявка: 2020143902, 30.12.2020

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
30.12.2020

Дата регистрации:
08.09.2021

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 30.12.2020

(45) Опубликовано: 08.09.2021 Бюл. № 25

Адрес для переписки:

125367, Москва, Волоколамское ш., 80,
Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение "Научный центр
неврологии"

(72) Автор(ы):

Раскуражев Антон Алексеевич (RU),
Танащян Маринэ Мовсесовна (RU),
Шабалина Алла Анатольевна (RU),
Корнилова Анастасия Александровна (RU),
Кузнецова Полина Игоревна (RU),
Бурмак Анастасия Геннадьевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение "Научный центр
неврологии" (ФГБНУ НЦН) (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: ВЛАСОВ В.В. и др.

Циркулирующие микроРНК крови при раке
легкого: перспективы использования для
диагностики, прогноза и оценки
эффективности терапии, Молекулярная
биология, 2015, том 49, N1, с. 55-66. ВЕЛИКИЙ
Д.А. и др. МикроРНК: Роль в развитии
сердечно-сосудистых заболеваний,
перспективы клинического применения,
Клиническая лабораторная (см. прод.)

(54) Способ определения атерогенных микроРНК у пациентов с каротидным атеросклерозом

(57) Формула изобретения

Способ определения атерогенных микроРНК у пациентов с каротидным атеросклерозом, включающий выделение микроРНК с последующим проведением ПЦР с обратной транскрипцией и определением микроРНК, отличающийся тем, что выделение из крови атерогенных микроРНК выполняют в три этапа, на первом этапе проводят лизис эритроцитов путем перемешивания на вортексе образца крови в течение 10 секунд с Лизис-буфером RBC, затем инкубируют 3-5 минут при комнатной температуре, после чего центрифугируют в течение 3 минут при 1000 об/мин для осаждения клеток, к полученному осадку вновь добавляют Лизис-буфер RBC, после чего к полученной лейкоцитарной взвеси добавляют буфер RL и встряхивают на вортексе до получения гомогенного состояния - лизата, на втором этапе лизат пропускают через колонку и центрифугируют в течение 3 минут при 14000 об/мин, к полученной суспензии-смеси добавляют 70% спирт, вновь пропускают через колонку и центрифугируют в

течение одной минуты при 6000 об/мин, полученную суспензию еще раз вносят в колонку и добавляют промывочный раствор А и центрифугируют в течение одной минуты при 14 об/мин, затем вносят в колонку DNase I и вновь центрифугируют в течение одной минуты при 14 об/мин, полученную смесь инкубируют при комнатной температуре в течение 15 минут, на третьем этапе в колонку вновь дважды вносят промывочный раствор А и дважды центрифугируют в течение одной минуты при 14000 об/мин, затем колонку с образцом высушивают на воздухе в течение 2 минут и вносят в нее Elution solution А для элюирования микроРНК, после чего центрифугируют в течение одной минуты при 2000 об/мин и затем в течение двух минут при 14000 об/мин, далее проводят определение в полученном образце микроРНК количества их копий на амплификаторе CFX Touch, полученный образец вносят в мини-пробирку Эппендорфа в количестве 2 мкл, добавляют к образцу буфер 3 мкл Polly А, 3 мкл АТФ, 1,8 мкл фермента Polly А и 10,2 мкл дистиллированной воды, инкубируют при 65°C в течение 10 минут, после чего вносят 18 мкл лигазного буфера, 27 мкл PEG 800 А, 3,6 мкл адаптера для лигирования, 9 мкл РНК-лигазы, 2,4 мкл дистиллированной воды и вновь полученную смесь инкубируют при 16°C в течение 1 часа, затем добавляют следующее: 36 мкл 5x BufferRT, 7,2 мкл смеси dNTP, 9 мкл праймера Universal RT, 15 мкл смеси Enzyme, 20 мкл дистиллированной воды, инкубируют при 85°C в течение 5 минут, получая экстрагированный образец, и далее готовят раствор перемешивания 300 мкл MiR Amp master Mix, 30 мкл MiR Amp primer Mix и 210 мкл дистиллированной воды, после чего 45 мкл полученного раствора добавляют к 5 мкл экстрагированного образца и проводят ПЦР, начиная с этапа обратной транскрипции по следующей программе РНК-1: 1 цикл - 5 минут при температуре 95°C, 14 циклов - 30 секунд при температуре 60°C, 10 минут при температуре 99°C, затем удержание при температуре 4°C, далее образец вносят в 5 чистых мини-пробирок Эппендорфа по 5 мкл в каждую, в которые затем вносят по 4 мкл дистиллированной воды и праймеры-зонды микроРНК в количестве 2 мкл при следующем порядке внесения праймеров-зондов микроРНК: в первую - 126-5p; во вторую - 126-3p; в третью - 33a-5p; в четвертую - 21-5p; в пятую - 21-3p, затем в каждую пробирку добавляют 10 мкл раствора основной смеси, содержащей TaqMan Fast Advanced и буфер TaqMan Fast Advanced Buffer в соотношении 1:100 соответственно и проводят программу амплификации РНК-2: 1 цикл - 20 мин при температуре 95°C, 40 циклов по 1 минуте при температуре 95°C, затем удержание при температуре 4°C, получая при этом количество копий атерогенных микроРНК.

(56) (продолжение):

диагностика, 2018, 63 (7), DOI://<http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-7-403-409>. GIRAL H. C. et al MicroRNAs in lipid metabolism and atherosclerosis. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2016 Oct; 30(5):665-676.