

# Выделение РНК из клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

Н.Ю.Буданова, Д.В.Гриненко

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Московская область, Российская Федерация

Методики выделения на основе гуанидина и формамида адаптированы для выделения суммарной РНК из клеток киллерных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в стационарной фазе культивирования с целью аналитического обеспечения производства двуспиральной РНК, являющейся перспективным иммуномодулятором. Выход суммарной РНК при выделении с гуанидином и формамидом составил 10,2 и 6,0 мкг/мг биомассы соответственно. Методика выделения при использовании формамида оптимальна для выделения РНК для дальнейшего количественного анализа двуспиральной РНК, поскольку требует значительно меньше времени, менее трудоемкая, экономичнее по затратам реагентов. Степень лизиса клеток дрожжей при использовании формамида составила ~20%.

**Ключевые слова:** выделение РНК, *Saccharomyces cerevisiae*, двуспиральная РНК, формамид, лизис клеток

**Для цитирования:** Буданова Н.Ю., Гриненко Д.В. Выделение РНК из клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Бактериология. 2024; 9(2): 40–44. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-2-40-44

## Extraction of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*

N.Yu.Budanova, D.V.Grinenko

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation

For analytical support in the production of double-stranded RNA of the killer yeast cells *Saccharomyces cerevisiae*, a promising immunomodulator, methods for isolating total RNA based on guanidine and formamide has been adapted for stationary phase culture. Yield of total RNA using guanidine and formamide were 10,2 and 6,0 µg per mg of biomass. Formamide-based isolation RNA was optimal for subsequent quantitative analysis of double-stranded RNA because it was less time-consuming and labor-intensive and also was more economical in terms of reagent expenses. The degree of lysis of yeast cells using formamide was approximately 20%.

**Key words:** RNA isolation, *Saccharomyces cerevisiae*, double-stranded RNA, formamide, cell lysis

**For citation:** Budanova N.Yu., Grinenko D.V. Extraction of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. Bacteriology. 2024; 9(2): 40–44. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-2-40-44

Существует необходимость в быстрых и простых методиках выделения интактной РНК высокого качества для использования как в генетических исследованиях и анализах, так и в биотехнологических процессах для количественного определения целевых продуктов на основе РНК.

Дрожжи давно и интенсивно используются в биотехнологии для производства ферментированных напитков, биоэтанола, рекомбинантных белков и т.д. Ценным свойством киллерных штаммов *Saccharomyces cerevisiae* является наличие в клетках двуспиральных полирибонуклеотидов (дсРНК), обладающих иммуномодулирующими свойствами [1–3]. Киллерный эффект, обусловленный наличием дсРНК,

проявляется в синтезе экзотоксинов (т.н. киллер-факторов, являющихся белками или гликопротеинами), летальных для других чувствительных штаммов дрожжей. Киллерная активность может быть направлена не только на представителей своего вида, но и против широкого спектра эукариотических и прокариотических организмов. Препараты на основе дсРНК обладают малой токсичностью, пролонгированным действием и обеспечивают достоверный противовирусный эффект.

Ранее в России из дрожжей *S. cerevisiae* производили два ветеринарных препарата на основе высокополимерной РНК, Полирибонат и Ридостин, причем Ридостин содержит высо-

### Для корреспонденции:

Буданова Наталья Юрьевна, научный сотрудник отдела биологических технологий ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24  
Телефон: (4967) 36-0000  
E-mail: budanova@obolensk.org

Статья поступила 12.04.2024, принята к печати 28.06.2024

### For correspondence:

Natalya Yu. Budanova, PhD, researcher of biotechnology department of State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Address: 24 "Quarter A" Territory, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow region, 142279, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0000  
E-mail: budanova@obolensk.org

The article was received 12.04.2024, accepted for publication 28.06.2024

комолекулярную дсРНК. В настоящее время эти препараты сняты с производства по причине плохого соотношения цена/качество. Вместо них выпускается ветеринарный препарат Виталанг-2 на основе одноцепочечной высокополимерной РНК, содержащей короткие двуспиральные участки. В отличие от Полирибоната и Ридостина, состоящих из гидрофильных молекул, хорошо растворимых в воде, Виталанг-2 содержит олеиновую кислоту, что, с одной стороны, приводит к снижению его растворимости в воде, а с другой – дает повышенную способность проникать через биологические мембраны и, как следствие, проявлять более высокую биологическую активность.

В Латвии выпускаются фармацевтический препарат Ларифан в разных лекарственных формах, содержащий дсРНК, производимый биотехнологически с помощью бактерий *Escherichia coli*, инфицированных бактериофагом.

В России в 2022 г. появился первый противовирусный препарат Радамин Виро на основе дсРНК, выделенной из киллерного штамма дрожжей *S. cerevisiae* [4]. Таким образом, известны бактериальные и киллерные дрожжевые продуценты дсРНК.

Для рекомбинантных бактерий количество целевого продукта (дсРНК) повышается при увеличении нарабатываемой биомассы [5], данные по кинетике наработки дсРНК в клетках дрожжей в литературе отсутствуют. Однако очевидно, что для оптимизации производственного процесса получения дсРНК от стадий эталонной культуры и биосинтеза (культивирования) до конечного выделения продукта необходимо наличие простого, достоверного и незатратного метода определения дсРНК как в конечной рецептуре, так и непосредственно (что более сложно) в биомассе штамма продуцента.

Определение дсРНК включает следующие этапы: выделение РНК (лизис клеток и, часто, выделение суммарной РНК) и определение целевых фрагментов дсРНК в лизате клеток или в образце суммарной РНК. Наиболее сложным этапом является лизис клеток, поскольку многие виды дрожжей, в т.ч. *S. cerevisiae*, отличаются чрезвычайно высокой устойчивостью к лизису, причем воздействие на клетки ограничено необходимостью не допустить деградации высокомолекулярной дсРНК.

Методики выделения РНК из клеток дрожжей требуют трудоемких и иногда длительных шагов. Классическим способом выделения РНК является фенол-хлороформная экстракция по Хромински [6], в ходе которой лизис осуществляется в растворе, содержащем гуанидин тиоцианат и лаурилсаркозинат, а РНК отделяется от ДНК экстракцией из кислого раствора, содержащего гуанидин тиоцианат, ацетат натрия, фенол и хлороформ (в растворе для выделения присутствуют также меркаптоэтанол и цитрат натрия).

Из методов лизиса для выделения РНК можно выделить метод лизиса клеток дрожжей при 65°C в присутствии додецилсульфата натрия [7], ферментативный лизис клеток дрожжей [8], метод «горячего» фенола [9].

Методы без механической гомогенизации часто используются для выделения РНК из клеток дрожжей логарифмической фазы роста, поскольку они дают РНК воспроизводимого качества и количества. Ситуация усложняется при работе с клетками в стационарной фазе роста, в этом случае жела-

тельно использовать гомогенизацию. Возможно, наиболее подходящим методом выделения РНК из устойчивых дрожжевых клеток является растирание клеток дрожжей, замороженных в жидком азоте, с абразивом (стеклянные шарики), как описано для клеток *Candida albicans*, собранных в стационарной фазе [10]. Однако такая пробоподготовка образца для количественного определения дсРНК на практике, скорее всего, будет невозможной (а также неподходящей для одновременной обработки серии образцов).

Еще один метод лизиса, относительно новый, разработанный для выделения РНК из грамотрицательных бактерий и дрожжей, изначально с использованием механической гомогенизации и формамида, *RNAsnap*<sup>TM</sup>, может быть использован для разрушения клеток дрожжей и без механической гомогенизации [11]. Лизис клеток при использовании формамида быстрый, простой, позволяет эффективно извлекать широкий спектр РНК, для дрожжей в логарифмической фазе роста выход РНК примерно в 3 раза выше по сравнению со стандартным протоколом горячего фенола [11]. Авторы отмечают, что при извлечении РНК формамидом и горячим фенолом имеются различия в эффективности извлечения разных РНК.

**Цель** данной работы состояла в исследовании и сравнении способов лизиса клеток киллерных дрожжей *S. cerevisiae*, полученных в стационарной фазе культивирования, в применении к задаче оптимизации процесса культивирования. Оценивали лизис клеток по таким параметрам, как выход суммарной РНК, трудоемкость, время анализа, возможность одновременной пробоподготовки нескольких образцов (до 10 образцов), стоимость и доступность реагентов для выделения РНК.

## Материалы и методы

**Штаммы.** Для выделения суммарной РНК использовали дрожжи хлебопекарные прессованные «Люкс Экстра» (САФ-НЕВА, хранение при 4°C), киллерные дрожжи *S. cerevisiae* ВКПМ Y-448 из рабочей коллекции (хранение при -70°C).

**Реактивы:** гуанидин тиоцианат (for molecular biology grade, PanReac Applichem), натрия цитрат 2-водный (pure EP, USP, Диаэм), β-меркаптоэтанол (Sigma-Aldrich/Merck), фенол (ультрачистый для молекулярной биологии, >99,7%, осч, diaGene, Диаэм), изоамиловый спирт (чда, Компонент-реактив), хлороформ (чда, Компонент-реактив), спирт этиловый 96% (ч, Константа-Фарм М), деионизованная вода без нуклеаз (Евроген), формамид (для молекулярной биологии, неоFroxx), ЭДТА динатриевая соль (Диаэм), зимолиаза лиофилизованная с буфером для хранения, 2000 Ед (Zymo Research), набор RNeasy Mini Kit для выделения РНК из клеток и тканей, из дрожжей, 50 реакций. Для проведения гель-электрофореза использовали маркеры размеров ДНК Sky-High (13 фрагментов от 250 до 10 000 п.н., 0,1 мг/мл (Хеликон), 6×Orange DNA Loading Dye (ThermoFisher Scientific).

Суммарное содержание РНК оценивали спектрофотометрически по поглощению ( $I = 260$  нм) при использовании спектрофотометра UNICO-2804 (United Products & Instruments, США). Для проведения гель-электрофореза использовали источник питания Electrophoresis Power Supply-EP5 601 (Amersham Pharmacia Biotech, США), камеру для горизон-

тального электрофореза SE-2, укомплектованную рамкой для геля, заливочным столиком с уровнем и гребенкой на 25 зубцов для образования лунок в геле (Хеликон, Россия), High Performance UltraViolet Transilluminator TFM-30 (UVP, США). В образцы вносили по 1 мкл красителя 6×Orange DNA Loading Dye.

#### **Методика выделения при использовании формамида**

При работе с навесками клеток дрожжей учитывали рекомендуемый объем лизирующего раствора ФАЭ для суспензии клеток определенной оптической плотности и объема аликвоты [11], необходимо минимум 5 мкл ФАЭ/1 мг дрожжей. В работе варьировали соотношение массы навески дрожжей / объема лизирующего раствора для получения максимального выхода суммарной РНК.

Для выделения суммарной РНК с формамидом готовили раствор ФАЭ: 98% формамида, 2% 0,5 М ЭДТА, pH = 8,03.

Отбирали навеску клеток дрожжей в интервале 1–14 мг в стерильные без нуклеаз пробирки типа эппендорф на 1,5 мл, добавляли 100 мкл раствора ФАЭ, ресуспендировали пипетированием. Суспензию клеток в ФАЭ нагревали в течение 10 мин при 70°C в твердотельном термостате Thermomixer comfort и центрифугировали при комнатной температуре в течение 10 мин при скорости 14 000 об./мин. Отбирали супернатант, избегая отбора клеток. Для определения суммарного содержания РНК дополнительно очищали образцы, добавляя 800 мкл воды, 500 мкл фенола (pH 4,56) и 200 мкл смеси хлороформ-изоамиловый спирт (24:1 по V).

#### **Методика выделения при использовании зимолиазы**

В эппендорфы отбирали аликвоту суспензии клеток дрожжей, содержащую  $(1-2) \cdot 10^7$  клеток, центрифугировали в течение 5 мин при +4°C при скорости 4000 об./мин. Удаляли супернатант и начинали работу с клетками по методике Qiagen RNeasy minikit [12].

#### **Методика выделения при использовании гуанидина тиоцианата**

Использовали концентрат клеток, полученных в стационарной фазе и замороженных после ферментации (хранение при -70°C).

Использовали классическую методику выделения суммарной РНК на основе гуанидина тиоцианата, модифицировали ее введением нагревания клеток в лизирующем растворе при +70°C в течение 40 мин. Для выделения РНК с механическим разрушением клеток готовили суспензию, содержащую 329 мг клеток и 42,5 мл лизирующего буфера с гуанидином; к 41,5 мл суспензии добавили 2,96 г стерильного кварцевого песка. Встряхивали на гомогенизаторе IKA Ultra Turrax tube drive 70 мин на скорости 4000 об./мин, затем отбирали 500 мкл суспензии, нагревали 40 мин при +70°C. Далее добавляли подкисленный фенол и продолжали методику аналогично без использования кварцевого песка.

#### **Разрушение клеток дрожжей при использовании ультразвукового гомогенизатора**

В пробирку на 50 мл вносили навеску 202 мг клеток дрожжей и 7,5 мл лизирующего буфера ФАЭ. Соотношение количества клеток и лизирующего буфера соответствовало

условиям лизиса без использования ультразвука. Использовали ультразвуковой гомогенизатор Bandelin Sonopuls HD 3400, зонд VS 200 T (Bandelin, Германия), подбирая условия разрушения 100% клеток. Разрушение клеток контролировали при помощи микроскопа OLYMPUS BX41. Определили условия разрушения 100% клеток: импульсный режим ультразвука (15 с ультразвук / 15 с пауза), общее время обработки 30 мин, 80% мощности, затем образец помещали в горячую воду (~90°C) на 20 мин. Цикл ультразвук/горячая вода для 100%-го разрушения клеток повторяли 3 раза. Суспензию разрушенных клеток центрифугировали (Eppendorf 5920R), центрифугат хранили при -18°C для дальнейшей работы.

Необходимо заметить, что ультразвук используемой мощности вызвал деградацию РНК, что выразилось в отсутствии высокомолекулярных РНК при анализе образцов методом гель-электрофореза. В данной работе ультразвук использовали только для спектрофотометрического определения суммарных фрагментов РНК, чтобы затем оценить степень лизиса клеток. Очевидно, что разрушение клеток ультразвуком не может быть использовано для количественного анализа целевых дсРНК.

#### **Оценка степени лизиса клеток**

Степень лизиса клеток оценивали по соотношению выделенного количества суммарной РНК по конкретной методике к количеству суммарной РНК при 100%-м разрушении клеток. Например, при 100%-м разрушении клеток с использованием ультразвука выход суммарной РНК составил 29,6 мкг/мг дрожжей. Выход суммарной РНК при использовании формамида (без ультразвука) – 5,8 мкг/мг дрожжей. Таким образом, методика выделения суммарной РНК с формамидом позволила лизировать ~20% клеток.

#### **Результаты исследования и их обсуждение**

В работе использовали штамм киллерных дрожжей ВКПМ Y-448 с наличием дсРНК и дрожжи хлебопекарные прессованные «Люкс Экстра», содержащие, по данным [13], также L-форму дсРНК. Выделение суммарной РНК из клеток дрожжей проводили при использовании следующих методик: на основе гуанидина и экстракции фенол/хлороформ, ферментативного лизиса при использовании набора Qiagen RNeasy minikit и по методике лизиса с формамидом. Оценивали результаты выделения по выходу суммарной РНК, чистоте препарата и наличию полос дсРНК в геле. Все методики оценивали также по показателям трудоемкости, времени выполнения, доступности реагентов, возможности масштабирования по количеству образцов. Результаты представлены в таблице. Во всех методиках использовали штамм Y-448, методику выделения с формамидом обрабатывали также на образце дрожжей «Люкс Экстра».

Максимальный выход суммарной РНК получили при использовании химического лизиса клеток гуанидином, выход составил 10,2 мкг/мг клеток дрожжей, чистоту выделенной РНК оценивали по соотношению оптической плотности на длинах волн 260 и 280 нм, A260/A280, значения соотношения были в интервале 2,0–2,1, что соответствовало чистому образцу суммарной РНК. Уменьшение выхода РНК при исполь-

Таблица. Сравнение методов лизиса клеток дрожжей  
Table. Comparison of yeast cell lysis methods

	Ферментативный / <i>Enzymatic</i>	Химические / <i>Chemical</i>	Химический с механическим разрушением клеток <sup>1</sup> / <i>Chemical with mechanical destruction of cells<sup>1</sup></i>	
	на основе зимолиазы <sup>2</sup> / <i>based on zymolyase<sup>2</sup></i>	гуанидин + фенол/хлороформ / <i>guanidine + phenol/chloroform</i>	ФАЭ <sup>3</sup>	гуанидин + фенол/ хлороформ / <i>guanidine + phenol/chloroform</i>
Выход суммарной РНК, мкг/мг биомассы дрожжей <sup>4,5</sup> / <i>Yield of total RNA, µg/mg yeast biomass<sup>4,5</sup></i>	4,8	10,2	6,0/5,8	7,6
Вероятность деградации дсРНК в процессе выделения <sup>6</sup> / <i>Probability of RNA degradation during isolation<sup>6</sup></i>	Низкая / <i>Low</i>	Низкая / <i>Low</i>	Низкая / <i>Low</i>	Средняя / <i>Medium</i>
Трудоемкость / <i>Labor intensity</i>	Низкая / <i>Low</i>	Средняя / <i>Medium</i>	Низкая / <i>Low</i>	Высокая / <i>High</i>
Время пробоподготовки 1 образца, мин / <i>Sample preparation time for 1 sample, min</i>	20–25	160	20	180–200
Возможность одновременной пробоподготовки нескольких образцов (до 10 образцов) / <i>Possibility of simultaneous sample preparation of several samples (up to 10 samples)</i>	+	+	+	-
Доступность реагентов для выделения РНК / <i>Availability of reagents for RNA isolation</i>	Низкая / <i>Low</i>	Средняя / <i>Medium</i>	Высокая /	Средняя / <i>Medium</i>

<sup>1</sup> при использовании кварцевого песка и гомогенизатора IKA Ultra Turrax tube drive; / <sup>1</sup> using silica sand and IKA Ultra Turrax tube drive homogenizer;  
<sup>2</sup> методика выделения Qiagen; / <sup>2</sup> Qiagen isolation technique;  
<sup>3</sup> при использовании штамма ВКПМ Y-448/хлебопекарных дрожжей; / <sup>3</sup> using VKPM strain Y-448/baker's yeast;  
<sup>4</sup> определяли спектрофотометрически; / <sup>4</sup> determined spectrophotometrically;  
<sup>5</sup> среднее, из 3 образцов, коэффициент вариации не превышает 20%; / <sup>5</sup> average, from 3 samples, the coefficient of variation does not exceed 20%;  
<sup>6</sup> при соблюдении правил работы с нуклеиновыми кислотами. / <sup>6</sup> if the rules of working with nucleic acids are observed.

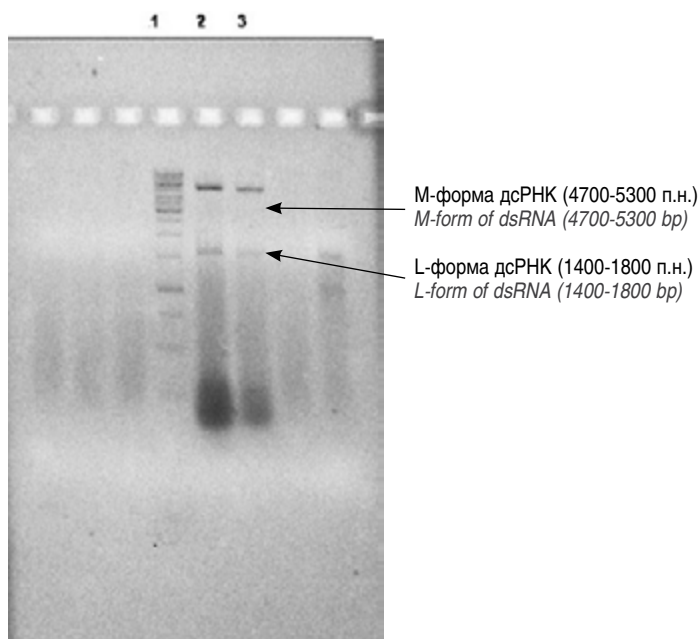


Рисунок. Гель-электрофорез выделенных образцов РНК: подтверждение наличия дсРНК в образцах штамма ВКПМ Y-448 (выделение с гуанидином). Краситель 6×Orange DNA Loading Dye. Дорожка 1: маркер размеров ДНК (13 фрагментов от 250 до 10 000 п.н.). На дорожках образцов 2, 3, полученных в стационарной фазе культивирования, обозначены две полосы, соответствующие молекулярным массам 1600 п.н. и 5000 п.н. (M- и L-формы дсРНК).

Figure. Gel electrophoresis of isolated RNA samples: confirmation of the presence of dsRNA in samples of VKPM strain Y-448 (isolation with guanidine). 6×Orange DNA Loading Dye. Lane 1: DNA size marker (13 fragments from 250 to 10,000 bp). Two bands corresponding to molecular masses of 1600 bp and 5000 bp (M- and L-forms of dsRNA) are marked on the lanes of samples 2, 3 obtained in the stationary phase of cultivation.

зовании механического разрушения клеток (кварцевый песок и гомогенизатор) связано с сорбцией нуклеиновых кислот на поверхности песка (силикагеля) и неполной десорбцией с поверхности в используемых условиях.

И химический, и ферментативный лизис клеток позволил получить дсРНК из клеток, собранных из логарифмической и стационарной фазы культивирования. Наличие в лизате M-формы (1400–1800 п.н.) и L-формы (4700–5300 п.н.) дсРНК подтверждали методом гель-электрофореза (рисунок). L-форма отвечает за образование белковых капсул, в которых находятся отдельно M- и L-формы дсРНК, M-форма – за синтез токсина и устойчивость к нему.

С учетом всех требований к способу лизиса клеток в приложении к задаче оптимизации производственного процесса получения дсРНК для выделения РНК с целью дальнейшего количественного анализа дсРНК оптимален способ лизиса на основе формамида. Методика выделения суммарной РНК с формамидом позволила лизировать ~20% клеток. Оценка степени лизиса необходима в дальнейшей работе для количественного определения дсРНК, нарабатанной во время ферментации.

#### Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

#### Financial support

The work was supported by the Sectoral Scientific Program of Rosпотребнадзор.

#### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

## Литература

1. Danilenko ED, Belkina AO, Sysoeva GM. Development of Drugs Based on High-Polymeric Double-Stranded RNA for Antiviral and Antitumor Therapy. *Biochem Mosc Suppl B Biomed Chem.* 2019;13(4):308-323. DOI: 10.1134/S1990750819040036
2. García K, Ramírez-Araya S, Díaz Á, Reyes-Cerpa S, Espejo RT, Higuera G, et al. Inactivated *E. coli* transformed with plasmids that produce dsRNA against infectious salmon anemia virus hemagglutinin show antiviral activity when added to infected ASK cells. *Front Microbiol.* 2015 Apr 16;6:300. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00300
3. Эршов ФИ, Наровлянский АН. Использование индукторов интерферона при вирусных инфекциях. *Вопросы вирусологии* 2015;60(2):5-10.
4. Радаева ОА, Таганов АВ, Рогожина ЕА. Перспективы использования индукторов интерферона на основе дуплексной РНК для лечения вирусных и бактериальных инфекций. *ПМЖ. Медицинское обозрение.* 2022;6(11):643-649. DOI: 10.32364/2587-6821-2022-6-11-643-649
5. Papic L, Rivas J, Toledo S, Romero J. Double-stranded RNA production and the kinetics of recombinant *Escherichia coli* HT115 in fed-batch culture. *Biotechnol. Rep.* 2018;20:e00292. DOI: 10.1016/j.btre.2018.e00292
6. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987 Apr;162(1):156-9. DOI: 10.1006/abio.1987.9999
7. Li J, Liu J, Wang X, Zhao L, Chen Q, Zhao W. A waterbath method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Anal Biochem.* 2009;384(1):189-190. DOI: 10.1016/j.ab.2008.09.021
8. Achilles J, Stahl F, Harms H, Müller S. Isolation of intact RNA from cytometrically sorted *Saccharomyces cerevisiae* for the analysis of intrapopulation diversity of gene expression. *Nat Protoc* 2007;2(9):2203-11. DOI: 10.1038/nprot.2007.322
9. Mannan MA, Sharma S, Ganesan K. Total RNA isolation from recalcitrant yeast cells. *Anal Biochem.* 2009;389(1):77-9. DOI: 10.1016/j.ab.2009.03.014
10. Uppuluri P, Perumal P, Chaffin WL. Analysis of RNA species of various sizes from stationary phase planktonic yeast cells of *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* 2007;7(1):110-7. DOI: 10.1111/j.1567-1364.2006.00143.x
11. Shedlovskiy D, Shcherbik N, Pestov DG. One-step hot formamide extraction of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA Biol.* 2017 Dec 2;14(12):1722-1726. DOI: 10.1080/15476286.2017.1345417
12. RNeasy Kits. RNA Extraction Kits. QIAGEN [Electronic resource]. Available at: <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/rna-purification/total-rna/rneasy-kits> (accessed 03.06.2024).
13. Шевченко ЗА, Телегина ЮВ, Лебедев ЛР. Способ получения препаратов на основе РНК. Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. 2017;8:9-13.

## References

1. Danilenko ED, Belkina AO, Sysoeva GM. Development of Drugs Based on High-Polymeric Double-Stranded RNA for Antiviral and Antitumor Therapy. *Biochem*

- Mosc Suppl B Biomed Chem. 2019;13(4):308-323. DOI: 10.1134/S1990750819040036
2. García K, Ramírez-Araya S, Díaz Á, Reyes-Cerpa S, Espejo RT, Higuera G, et al. Inactivated *E. coli* transformed with plasmids that produce dsRNA against infectious salmon anemia virus hemagglutinin show antiviral activity when added to infected ASK cells. *Front Microbiol.* 2015 Apr 16;6:300. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00300
3. Ershov FI, Narovlyansky AN. Usage of interferon inducers during viral infections. *Problems of Virology.* 2015;60(2):5-10. (In Russian).
4. Radaeva OA, Taganov AV, Rogozhina EA. Prospects of using interferon inducers of the double stranded RNA type for the treatment of viral and bacterial infections. *Russian Medical Inquiry.* 2022;6(11):643-649. DOI: 10.32364/2587-6821-2022-6-11-643-649 (In Russian).
5. Papic L, Rivas J, Toledo S, Romero J. Double-stranded RNA production and the kinetics of recombinant *Escherichia coli* HT115 in fed-batch culture. *Biotechnol. Rep.* 2018;20:e00292. DOI: 10.1016/j.btre.2018.e00292
6. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987 Apr;162(1):156-9. DOI: 10.1006/abio.1987.9999
7. Li J, Liu J, Wang X, Zhao L, Chen Q, Zhao W. A waterbath method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Anal Biochem.* 2009;384(1):189-190. DOI: 10.1016/j.ab.2008.09.021
8. Achilles J, Stahl F, Harms H, Müller S. Isolation of intact RNA from cytometrically sorted *Saccharomyces cerevisiae* for the analysis of intrapopulation diversity of gene expression. *Nat Protoc* 2007;2(9):2203-11. DOI: 10.1038/nprot.2007.322
9. Mannan MA, Sharma S, Ganesan K. Total RNA isolation from recalcitrant yeast cells. *Anal Biochem.* 2009;389(1):77-9. DOI: 10.1016/j.ab.2009.03.014
10. Uppuluri P, Perumal P, Chaffin WL. Analysis of RNA species of various sizes from stationary phase planktonic yeast cells of *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* 2007;7(1):110-7. DOI: 10.1111/j.1567-1364.2006.00143.x
11. Shedlovskiy D, Shcherbik N, Pestov DG. One-step hot formamide extraction of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA Biol.* 2017 Dec 2;14(12):1722-1726. DOI: 10.1080/15476286.2017.1345417
12. RNeasy Kits. RNA Extraction Kits. QIAGEN [Electronic resource]. Available at: <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/rna-purification/total-rna/rneasy-kits> (accessed 03.06.2024).
13. Shevchenko ZA, Teligina YuV, Lebedev LR. A method for obtaining RNA-based preparations. *Current problems of the humanities and natural sciences.* 2017;8:9-13. (In Russian).

### Информация о соавторе:

Гриненко Дмитрий Владимирович, инженер II категории отдела биологических технологий ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

### Information about co-author:

Dmitry V. Grinenko, Engineer Category II of the Department of Biological Technologies State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор