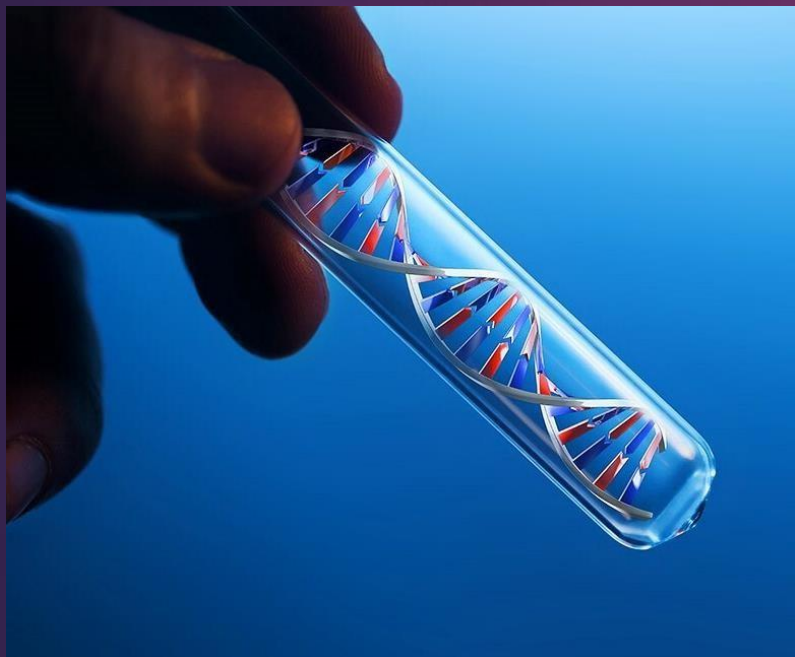


ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ГЕНЕТИКИ И РАЗВЕДЕНИЯ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ-ФИЛИАЛ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО
БЮДЖЕТНОГО НАУЧНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ЖИВОТНОВОДСТВА - ВИЖ ИМЕНИ АКАДЕМИКА Л.К. ЭРНСТА» (ВНИИГРЖ)



Выделение ДНК: теоретические основы

Рябова Анна, м.н.с. лаборатории молекулярной генетики ВНИИГРЖ

ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК



Основной задачей в процессе выделения ДНК из различных биоматериалов является диспергирование ткани для более легкого разрушения клеток, а затем очистка ДНК от сопутствующих ей белков и посторонних примесей для получения препарата с чистотой, которая была бы пригодна для постановки ПЦР.



Методы выделения ДНК



В последнее время широкое распространение получили современные методы, позволяющие экстрагировать высокоочищенную ДНК, а также автоматизировать процесс ее выделения. Это широкий спектр коммерческих наборов реагентов, производимых американскими и европейскими компаниями. Каждый из этих методов имеет свои преимущества и недостатки.



Основные методы выделения ДНК



Самые распространенные и прогрессивные методики выделения ДНК представлены на слайде. Они различаются между собой как по трудоёмкости и используемым материалам, так и по принципу действия.



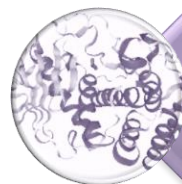
Фенол-хлороформная
экстракция



Выделение на спин-колонках



Выделение на магнитных
частицах



Ферментативное выделение

Выделение на спин-колонках



Метод был предложен в 1979 году и основывается на способности ДНК связываться с силикатами при щелочных условиях. Спин-колонки представляют собой специальные фильтры, удерживающие ДНК во время центрифугирования, благодаря чему ненужные компоненты легко удаляются из пробы.



Выделение на магнитных частицах



К 1999 году метод выделения ДНК на спин-колонках был улучшен до выделения на магнитных частицах. Теперь вместо связывания с силикатами, ДНК связывалась с веществами, нанесенными на магнитные частицы, сохранение которых обеспечивалось расположением пробирок с ДНК в специальных магнитных штативах.



Ферментативное выделение



Компании MicroGEM удалось разработать методику ферментативного температурно-зависимого выделения ДНК в одной пробирке благодаря использованию термофильной протеиназы EA1 вместе с мезофильными гидролазами. Её особенность заключается в том, что нагревание образцов до 75°C активирует протеиназу, а последующее нагревание до 95°C – инактивируют.



Основные этапы выделения ДНК методом фенол-хлороформной экстракции



Из всех известных способов выделения ДНК наиболее универсален и качественен по очистке «классический» метод, основанный на использовании различных лизирующих буферов, протеиназы К и органических растворителей (фенол/хлороформ). Метод простой и надежный, существует в ряде модификаций, как и многие другие методы. С другой стороны, этот метод является и наиболее трудоемким.



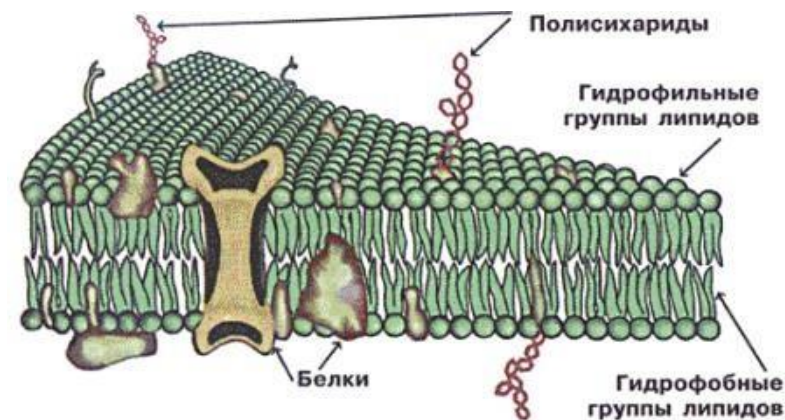
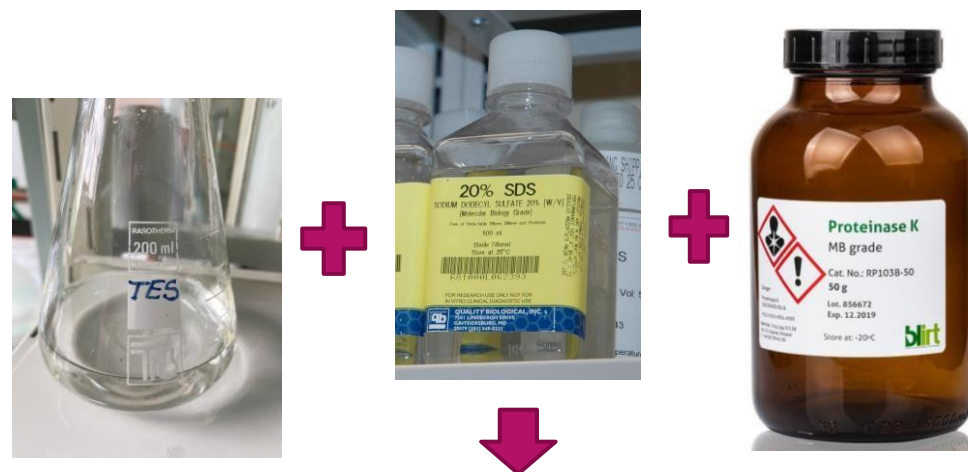
Основные этапы выделения ДНК методом фенол-хлороформной экстракции: 1 этап – лизис



Обычная процедура лизиса включает:

- Механическое разрушение (например, измельчение);
- Химическую обработку (например, лизис с помощью детергентов TES или SDS);
- Ферментативное расщепление белков (например, с помощью протеиназы К).

Все стадии лизиса чередуются с центрифугированием.



Основные этапы выделения ДНК методом фенол-хлороформной экстракции: 2 этап – очистка



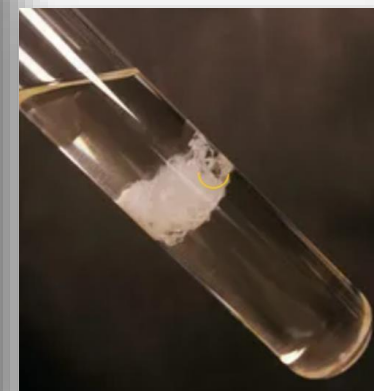
Очистка нуклеиновых кислот от от лишних примесей (белки, липиды и т.д.) осуществляется с помощью:

- фенола;
- хлороформа.

Клеточный лизат обрабатывают смесью фенол/хлороформ/изоамиловый спирт.

- ▶ Фенол удаляет из водной фазы белки.
- ▶ Хлороформ удаляет остатки фенола. Также хлороформ облегчает разделение водной и органических фаз. Обычно водная фаза формирует верхнюю фазу.
- ▶ Изоамиловый спирт является пеногасителем.

Когда комплекс нуклеиновых кислот очищен, можно проводить следующую стадию всей – осаждение.

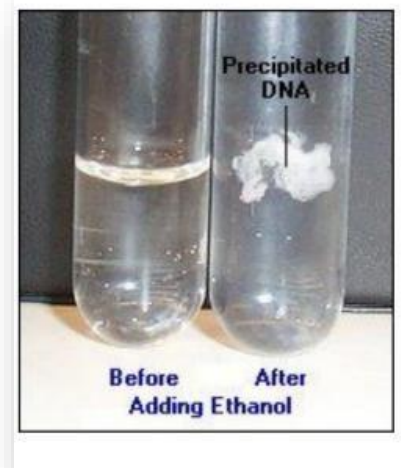


Основные этапы выделения ДНК методом фенол-хлороформной экстракции: 3 этап – осаждение



На этом этапе к образцу добавляют 2 объема холодного (-20 °C) 96% этанола. Аккуратно перемешивают содержимое пробирки. Осаждение ДНК визуально контролируется по появлению «белкообразных» нитей в растворе. Другие органические соединения клетки и низкомолекулярные вещества теряются при высаживании ДНК этанолом, поскольку остаются в растворе.

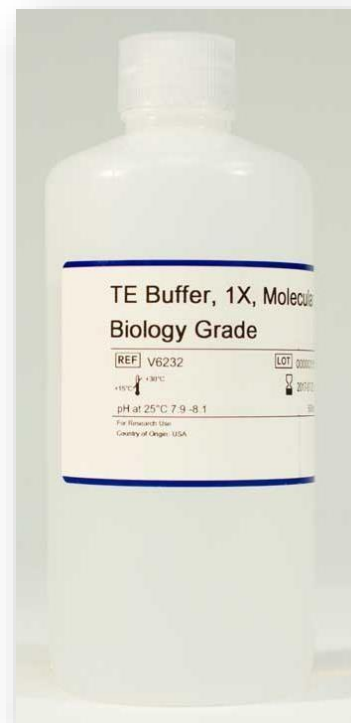
Последовательная обработка 70% этанолом позволяет провести дополнительную очистку, или отмывку нуклеиновых кислот от остатка соли.



Основные этапы выделения ДНК методом фенол-хлороформной экстракции: 4 этап – растворение



Полученный в результате центрифугирования образца осадок нуклеиновых кислот, растворяют в специальном буфере для хранения ДНК – буфере TE (Трис-ЭДТА) или деионизированной воде. Входящий в его состав хелатирующий агент – этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) предотвращает воздействие на ДНК клеточных нуклеаз, поскольку связывает необходимые для их работы катионы Mg^{2+} .



Меры предосторожности



Фенол весьма ядовит. При вдыхании вызывает нарушение функций нервной системы. Пыль, пары и раствор фенола раздражают слизистые оболочки глаз, дыхательных путей, кожу, вызывая химические ожоги. Попадая в организм, фенол очень быстро всасывается даже через неповрежденные участки кожи и уже через несколько минут начинает воздействовать на ткани головного мозга. Сначала возникает кратковременное возбуждение, а потом и паралич дыхательного центра. Даже при воздействии минимальных доз фенола наблюдается чихание, кашель, головная боль, головокружение, бледность, тошнота, упадок сил. Тяжелые случаи отравления характеризуются бессознательным состоянием, синюшностью, затруднением дыхания, нечувствительностью роговицы, скорым, едва ощутимым пульсом, холодным потом, нередко судорогами. Фенол является канцерогенным химическим веществом и способен вызвать рак.





Спасибо за внимание!

Исследование проведено в рамках выполнения научных исследований
министерства науки и высшего образования РФ по теме № 0445-2021-0010