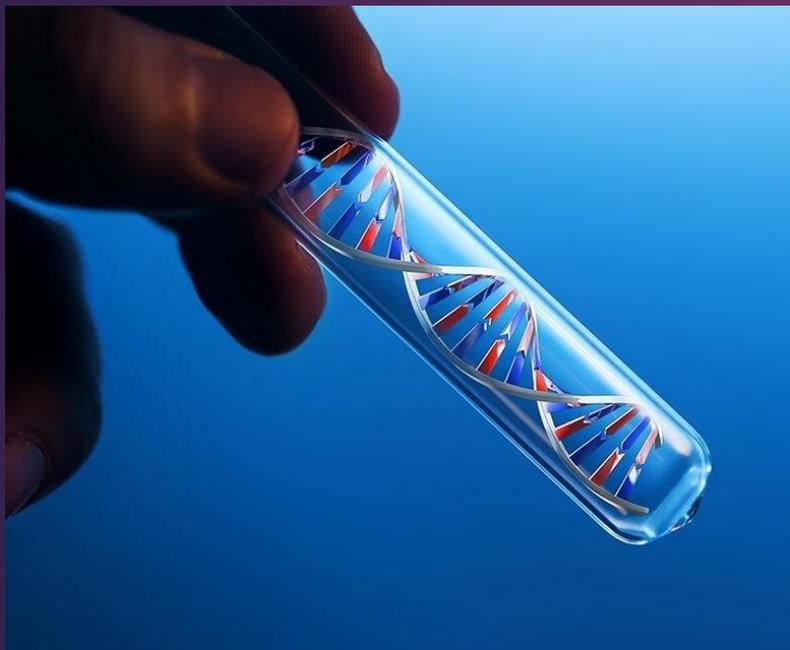


ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ГЕНЕТИКИ И РАЗВЕДЕНИЯ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ-ФИЛИАЛ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО
БЮДЖЕТНОГО НАУЧНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ЖИВОТНОВОДСТВА - ВИЖ ИМЕНИ АКАДЕМИКА Л.К. ЭРНСТА» (ВНИИГРЖ)



Практикум по выделению ДНК из крови кур

Азовцева Анастасия, м.н.с. лаборатории молекулярной генетики ВНИИГРЖ

Выделение ДНК методом фенол-хлороформной экстракции из крови кур



Для выделения ДНК можно использовать различные типы биоматериалов. Некоторые из них требуют дополнительного этапа обработки - измельчения или гомогенизации.



У кур ДНК чаще всего извлекают из крови или перьев. Для этого кровь из подкрыльцовой вены отбирают в стерильные пробирки типа «Эппендорф» объемом 0,5 мл с антикоагулянтом ЭДТА.



Выделение ДНК методом фенол-хлороформной экстракции из крови кур



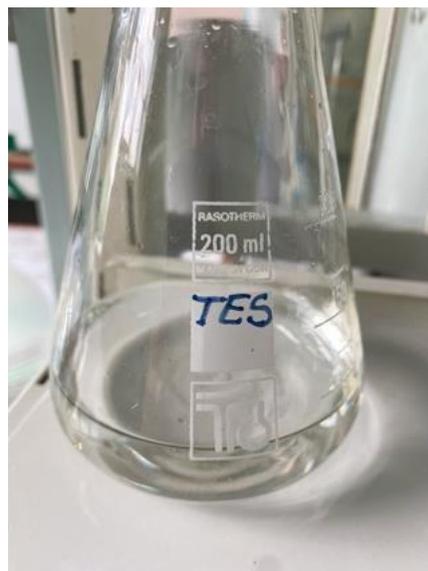
Внесение биоматериала в пробирку на 2 мл (40 мкл крови кур)

Добавление 1 мл буферного раствора TES

Суспендирование осадка в добавленном буфере

Центрифугирование пробирок при 12.000 оборотов/мин в течение 2 мин. *По завершении на дне пробирки должен просматриваться осадок*

Сливание надосадовой жидкости. *Осадок должен остаться на дне пробирки*



Выделение ДНК методом фенол-хлороформной экстракции из крови кур



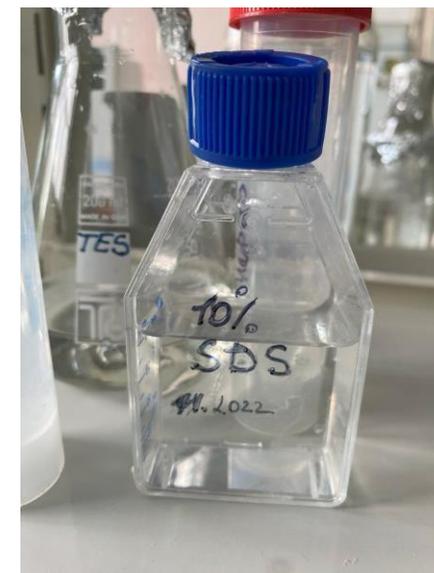
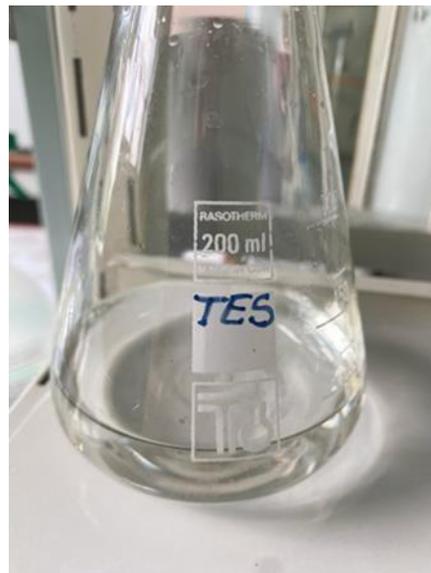
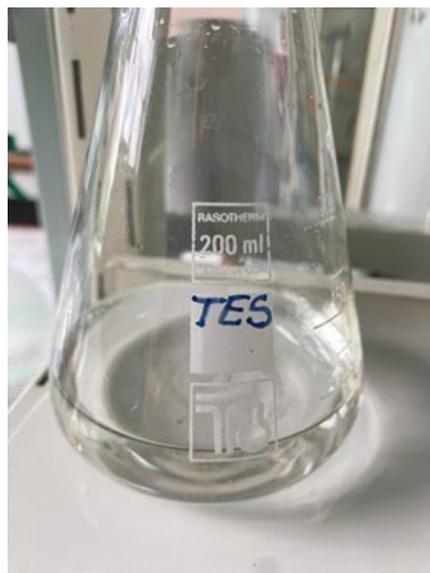
Добавление 1 мл TES-буфера

Центрифугирование при тех же условиях, затем сливание надосадочной жидкости.
Дублирование этапа производится для достижения лучшей очистки осадка

Добавление 0,5 мл (500 мкл) буфера TES. Суспендирование осадка. Перемешивание образцов для лучшего растворения белков

Добавление 10-15 мкл протеиназы К. Аккуратное перемешивание

Добавление 30 мкл 10%-ого SDS. Аккуратное перемешивание



Выделение ДНК методом фенол-хлороформной экстракции из крови кур



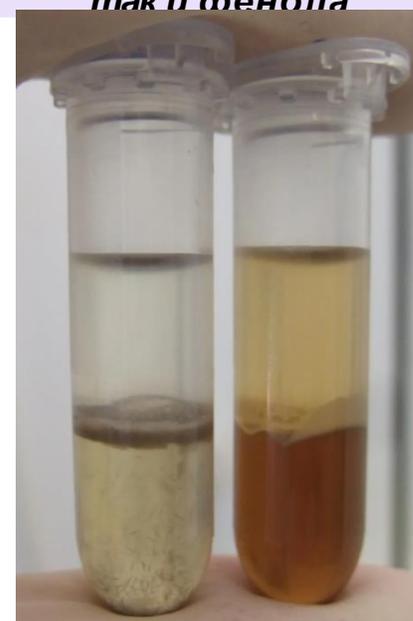
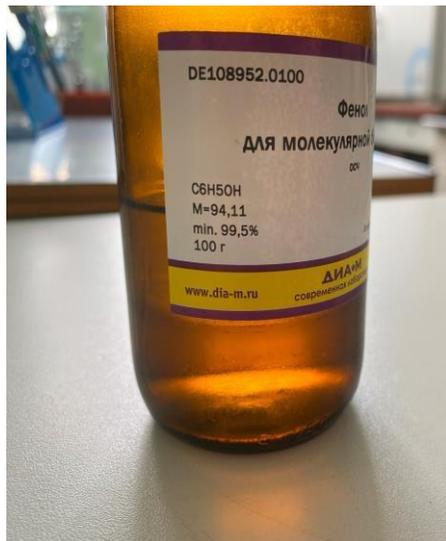
Инкубирование образцов в термостате в течение 2 часов при температуре 56°C

Добавление фенола в количестве, равном объему пробы – 0,5 мл (500 мкл). Добавлять строго нижнюю фазу фенола

Аккуратное перемешивание образцов сначала вручную, затем на ротаторе в течение 10 мин

Отбор верхней фазы (ДНК) в пробирку типа Эппендорф на 1,5 мл. **Важно отобрать исключительно верхнюю фазу, не допуская попадания в новую пробирку как белков, так и фенола**

Добавление 25 мкл 5M NaCl



Выделение ДНК методом фенол-хлороформной экстракции из крови кур



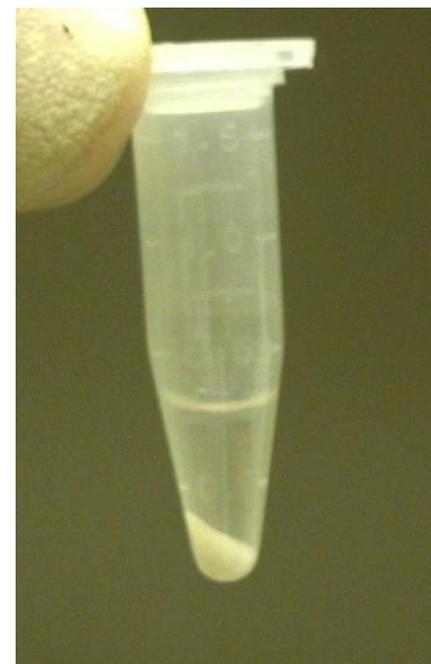
Добавление 96%-ого этанола в раствор в соотношении 2:1, предварительно охлажденного в морозильной камере до -18°C . Если в пробирку удалось отобрать 500 мкл верхней фазы ДНК, добавляют 1 мл этанола

Аккуратное перемешивание пробирок до появления нитей ДНК

Центрифугирование при 8.000 оборотов/мин в течение 5 минут

Аккуратное сливание надосадочной жидкости. На дне в виде белой горошины должна просматриваться ДНК

Добавление 1 мл 70%-ого этанола, охлажденного до -18°C . Этот шаг необходим для того, чтобы смыть с ДНК остатки соли



Выделение ДНК методом фенол-хлороформной экстракции из крови кур

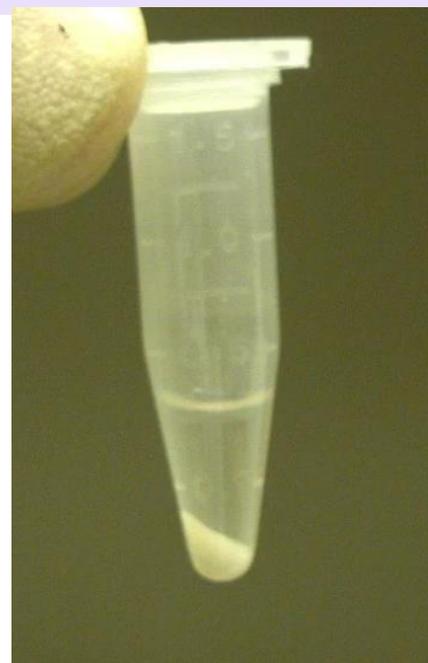
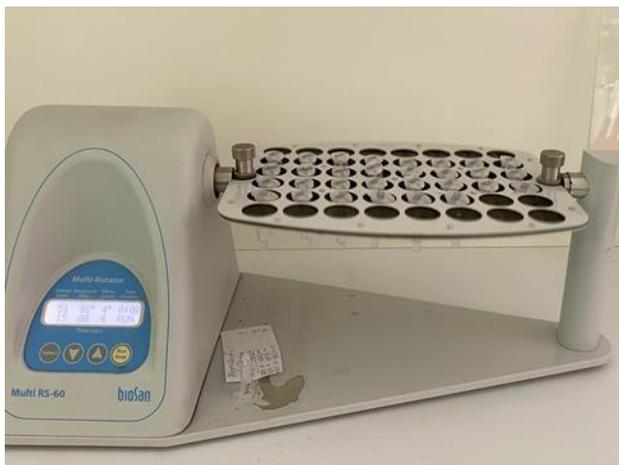


Перемешивание на ротаторе в течение 10 минут

Центрифугирование при 8 тыс. оборотов/мин в течение 5 минут

Аккуратное сливание надосадочной жидкости. *Осадок должен оставаться на дне пробирки. Дополнительно необходимо просушить горло пробирки фильтровальной бумагой*

Добавление ТЕ-буфера (от 50 мкл до 1 мл)



Выделение ДНК методом фенол-хлороформной экстракции из крови кур



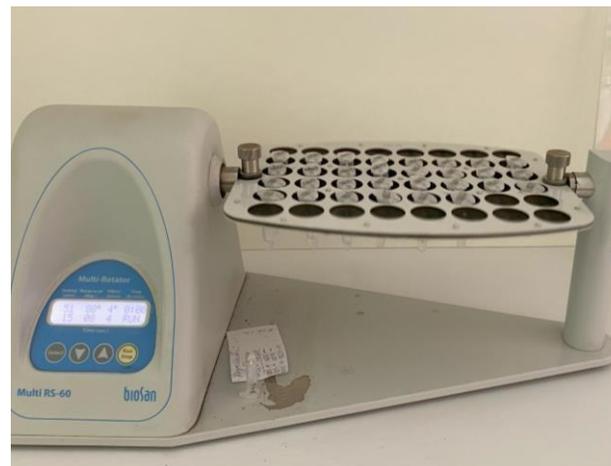
Инкубирование открытых пробирок в термостате при температуре $+56^{\circ}\text{C}$ в течение 10 минут.

Верхний порог инкубирования открытых пробирок – 20 минут. Превышение этого времени может вызвать повреждение ДНК. Инкубирование производится для испарения остатков этанола

Инкубирование закрытых пробирок в термостате при тех же условиях

Перемешивание на ротаторе в течение 2 суток для полного растворения ДНК

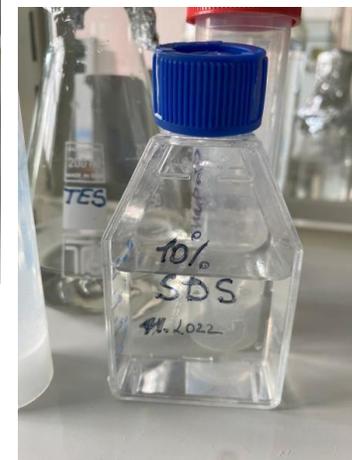
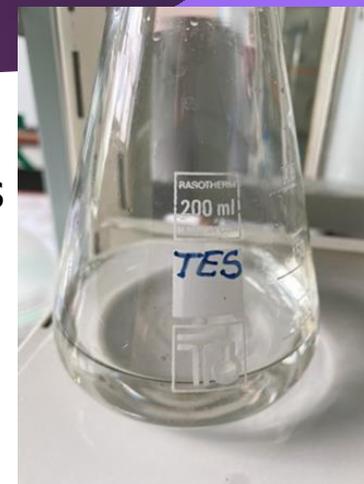
Замораживание образцов при температуре -18°C – 20°C



Выделение ДНК методом фенол-хлороформной экстракции из крови кур



1. Буфер TES состоит из Tris (трис (гидроксиметил) аминметан), ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота) и NaCl. Tris используется в качестве буфера для растворения нуклеиновых кислот, а ЭДТА оказывает ингибирующее действие на многие нуклеазы.
2. SDS - додецилсульфат натрия; детергент, разрушающий клеточную мембрану.
3. Хлорид натрия (NaCl) используется для осаждения ДНК из растворов, содержащих SDS, т.к. только NaCl способен сохранять SDS в растворенном виде, препятствуя его осаждению вместе с ДНК. При добавлении соли в растворе появляются белые мутноватые тянущиеся разводы, которые и являются ДНК.



Выделение ДНК методом фенол-хлороформной экстракции из крови кур



4. Этанол – второй компонент, использующийся для осаждения. Нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК) являются гидрофильными молекулами из-за отрицательно заряженных фосфатных групп. При добавлении соли, положительно заряженные ионы натрия должны нейтрализовать отрицательный заряд фосфатных групп, делая тем самым ДНК менее гидрофильными и, соответственно, менее растворимыми в воде. Однако сближение ионов натрия и фосфатных групп в воде затруднено ввиду высокой диэлектрической проницаемости последней. Этанол же, с его низкой диэлектрической проницаемостью, ощутимо облегчает их взаимодействие.

5. TE-буфер содержит Tris и ЭДТА и используется для растворения нуклеиновых кислот и предотвращения их деградации. Количество буфера, которое нужно добавить, пропорционально количеству выпавшей ДНК. При наличии сомнений рекомендуется добавить меньшее количество буфера, т.к. при необходимости образец проще доразбавить до нужной концентрации, чем переосаждать заново.



Выделение ДНК методом фенол-хлороформной экстракции из крови кур



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