

Занятие №3. Методика выделения ДНК, оценка качества выделения.

Этапы выделения ДНК из клеточного образца

- 0. Гомогенизация образца.
- 1. Лизис клеток.
 - – SDS (SLS, додецилсульфат (лаурилсульфат) натрия), лизоцим, гуанидина изотиоцианат (GITC), протеазы
- 2. Удаление примесей (белки, липиды и др.).
 - – фенол+хлороформ
 - – высаливание
- 3. Преципитация ДНК.
 - – осаждение (этанол, изопропанол)
 - – преципитация на сорбент (колонки, силикагель)

Этап 0. Гомогенизация образца ткани

- Этап требуется в случае необходимости выделения ДНК из материала, содержащего прочные механические ткани (членистоногие, жёсткие части растений).
- Осуществляется механически: перетирание материала в пестике в жидком азоте до образования мелкого порошка (пудры).

Этап 1. Лизис клеток

- Разрушение клеточной оболочки – клеточной стенки (если есть) и мембран
- 1. Физический способ.
 - ультразвуковая обработка
 - воздействие гипотонической среды
- 2. Химический способ.
 - детергенты (напр., додецилсульфат натрия, SDS) – ПАВ, растворяют компоненты клетки, денатурируют белки
 - хаотропные агенты (гуанидинизотиоцианат, GITC) – увеличивают растворимость липидов и белков в воде
 - лизирующие ферменты (лизоцим) – разрушают клеточную стенку

Этап 2. Удаление примесей

- Разрушение “ненужных” нуклеиновых кислот специфическими нуклеазами (напр., РНКаза)
- Разрушение белков протеазами (напр., протеиназа К, проназа)
- Денатурирование белков и растворение неполярных молекул (липиды) органическим растворителем (фенол) + ЦФ
-

Этап 3. Преципитация ДНК

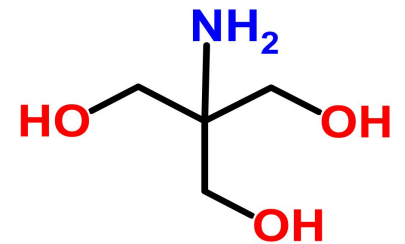
- 1. Осаждение ДНК из раствора:
 - соль (NaCl, AcNa) + концентрированный спирт (изопропанол или этанол, 96-100%) + ЦФ

- 2. Сорбция ДНК на твёрдом носителе:
 - силикаты (частицы силикагеля, фильтр колонок)
 - магнитные частицы (могут быть также покрыты силикатами, либо олигонуклеотидными фрагментами)

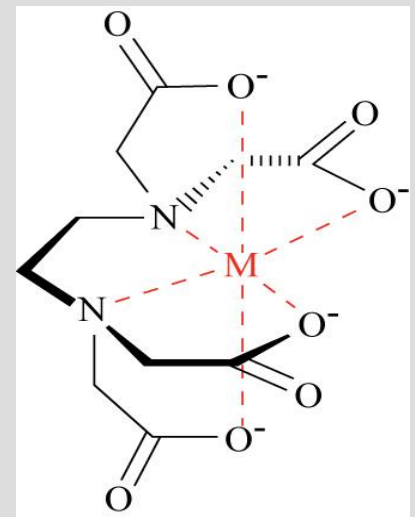
Этап 4. Растворение ДНК

Зачастую в качестве буфера для растворения (или элюции) ДНК используют ТЕ-буфер (Tris/EDTA-буфер)

Трис (Tris, трис(гидроксиметил)аминометан) обладает буферными свойствами (pH=7-8; для РНК лучше подходит ТЕ-буфер с pH=7,5, для ДНК – pH=8,0).



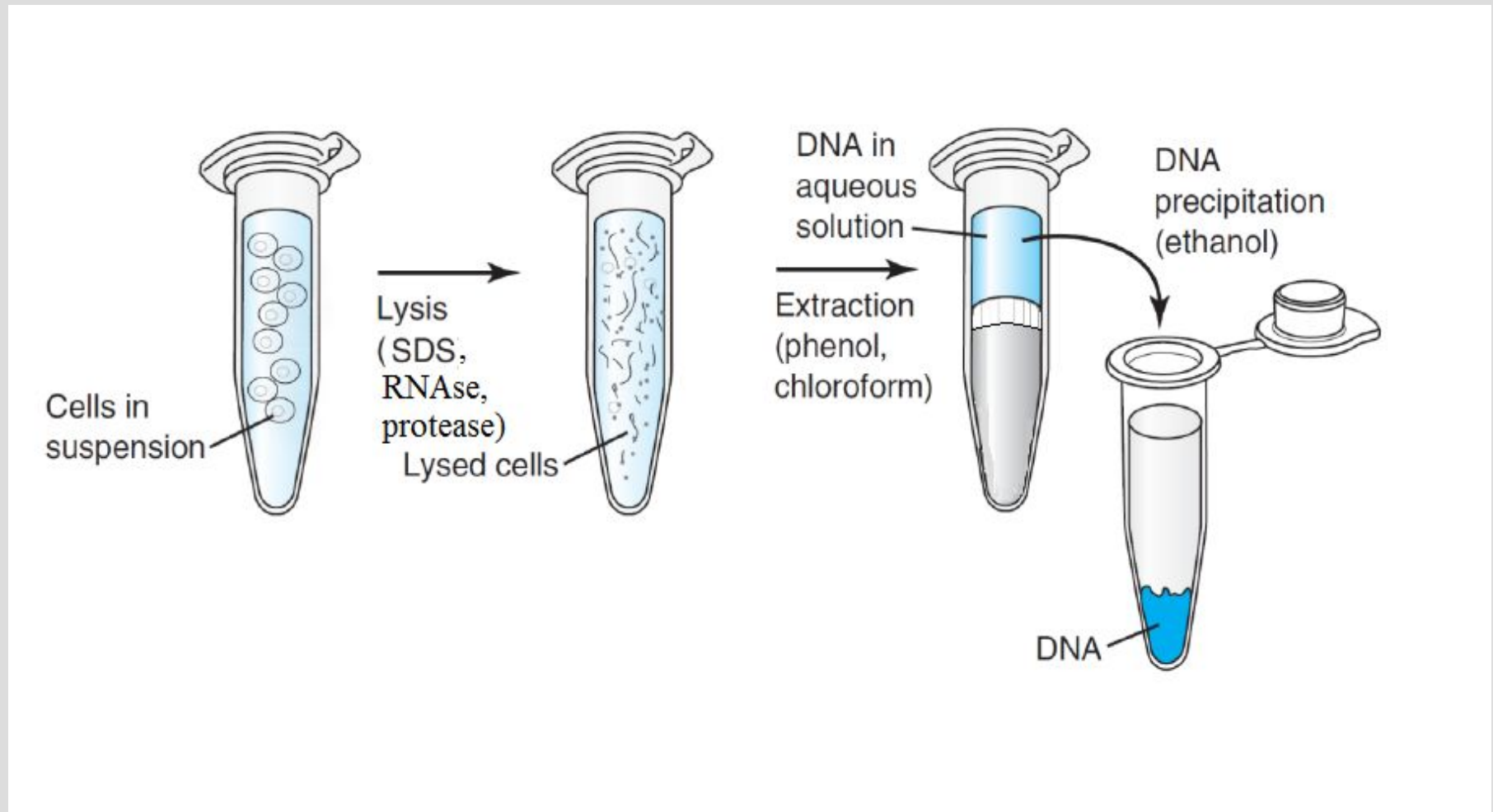
ЭДТА (EDTA, этилендиаминтетраацетат) связывает ионы Mg^{2+} , необходимые для функционирования ферментов-нуклеаз, защищая тем самым ДНК от гидролиза.



Сохранность выделенной ДНК в ТЕ-буфере

- +4°C: недели
- -20°C: месяцы
- -80°C: годы

Выделение ДНК фенол-хлороформным методом



Разделение ДНК и примесей по градиенту плотности в фенол-хлороформном методе



Варианты фенольной экстракции при выделении ДНК или РНК



Для выделения РНК используют реагент, содержащий GITC и кислый фенол – TRIzol.

Преимущества и недостатки метода фенол-хлороформной экстракции

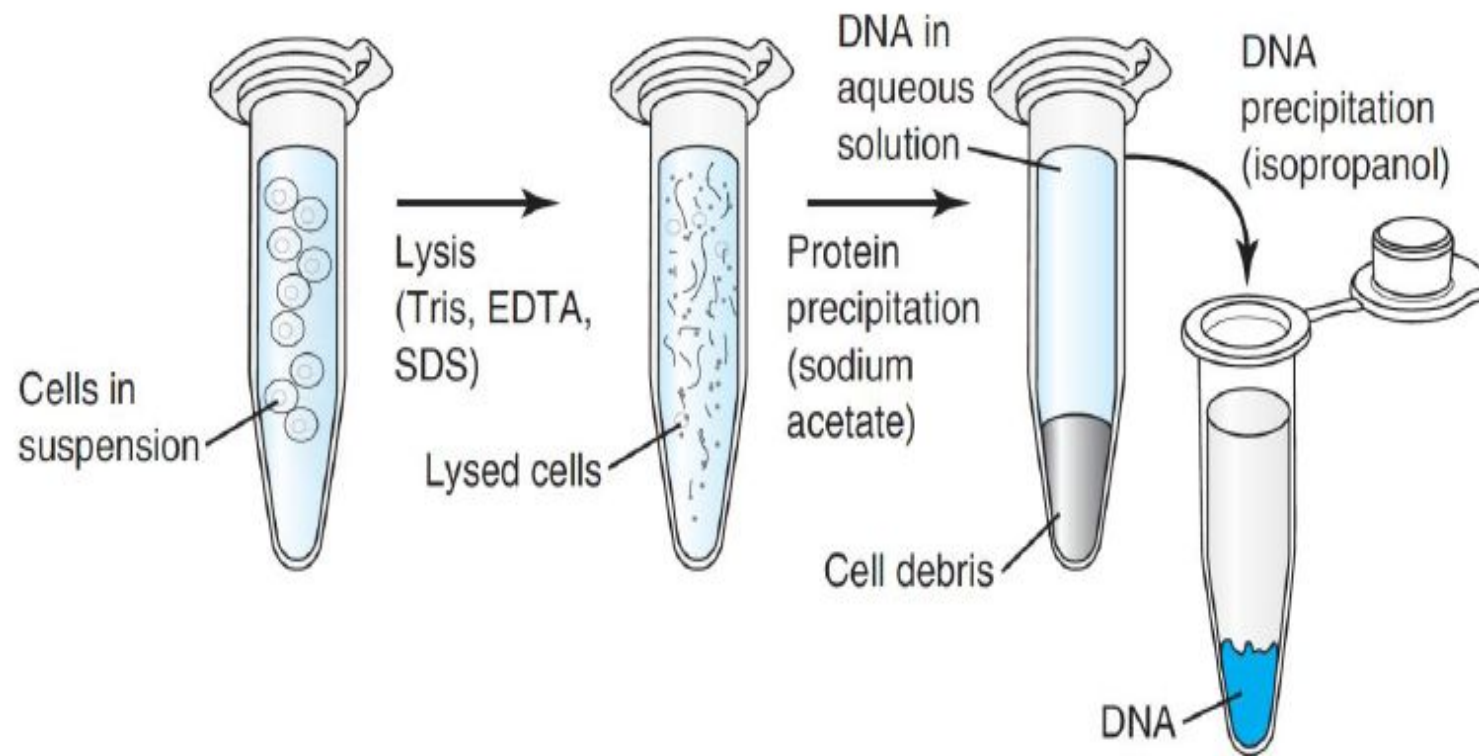
- **Преимущества:**

- подходит для выделения из разных материалов
- является “золотым стандартом” выделения
- обеспечивает высокий выход ДНК

- **Недостатки:**

- относительно трудоёмок
- работа с токсичными реагентами (фенол, хлороформ)

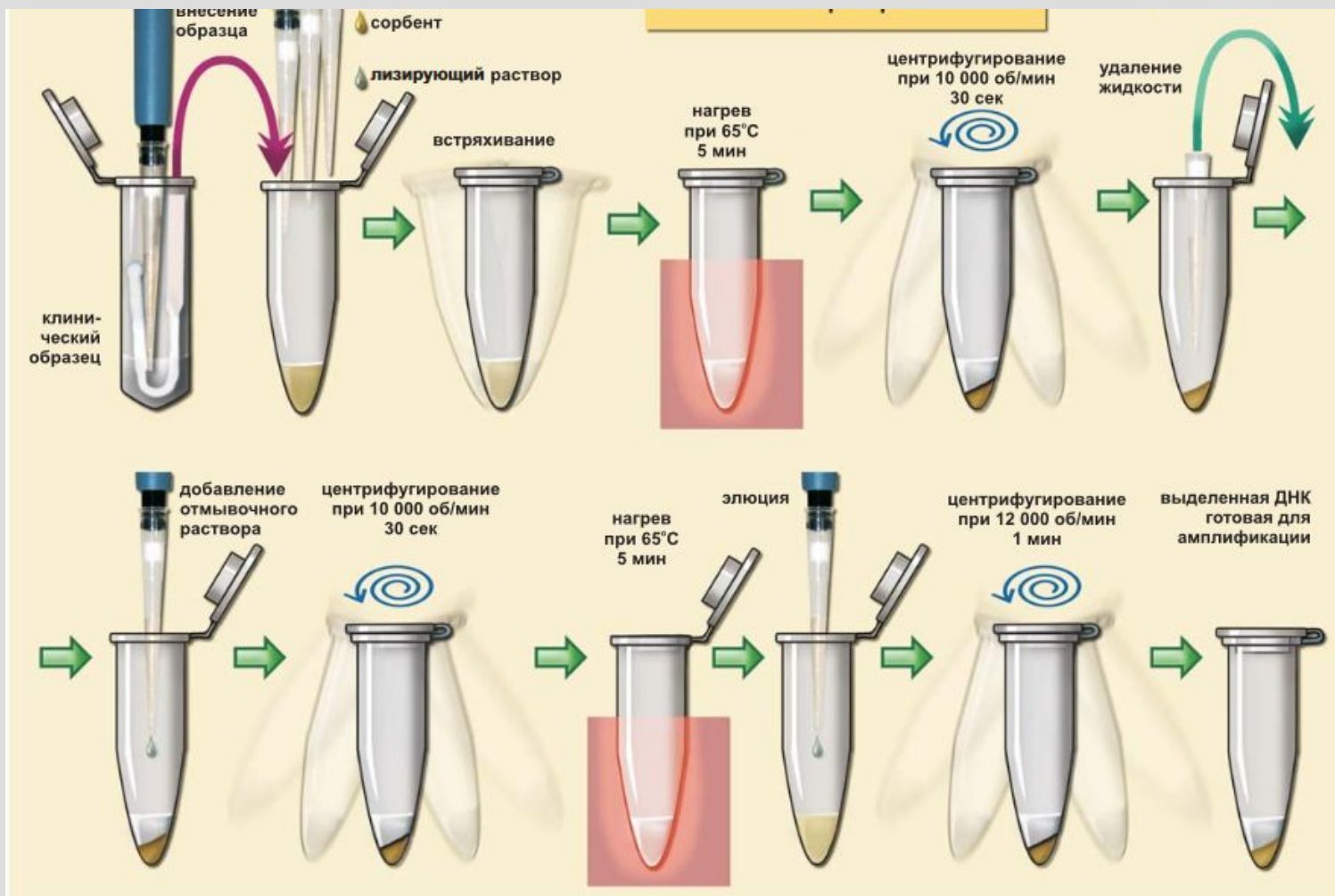
Метод выделения ДНК простым осаждением



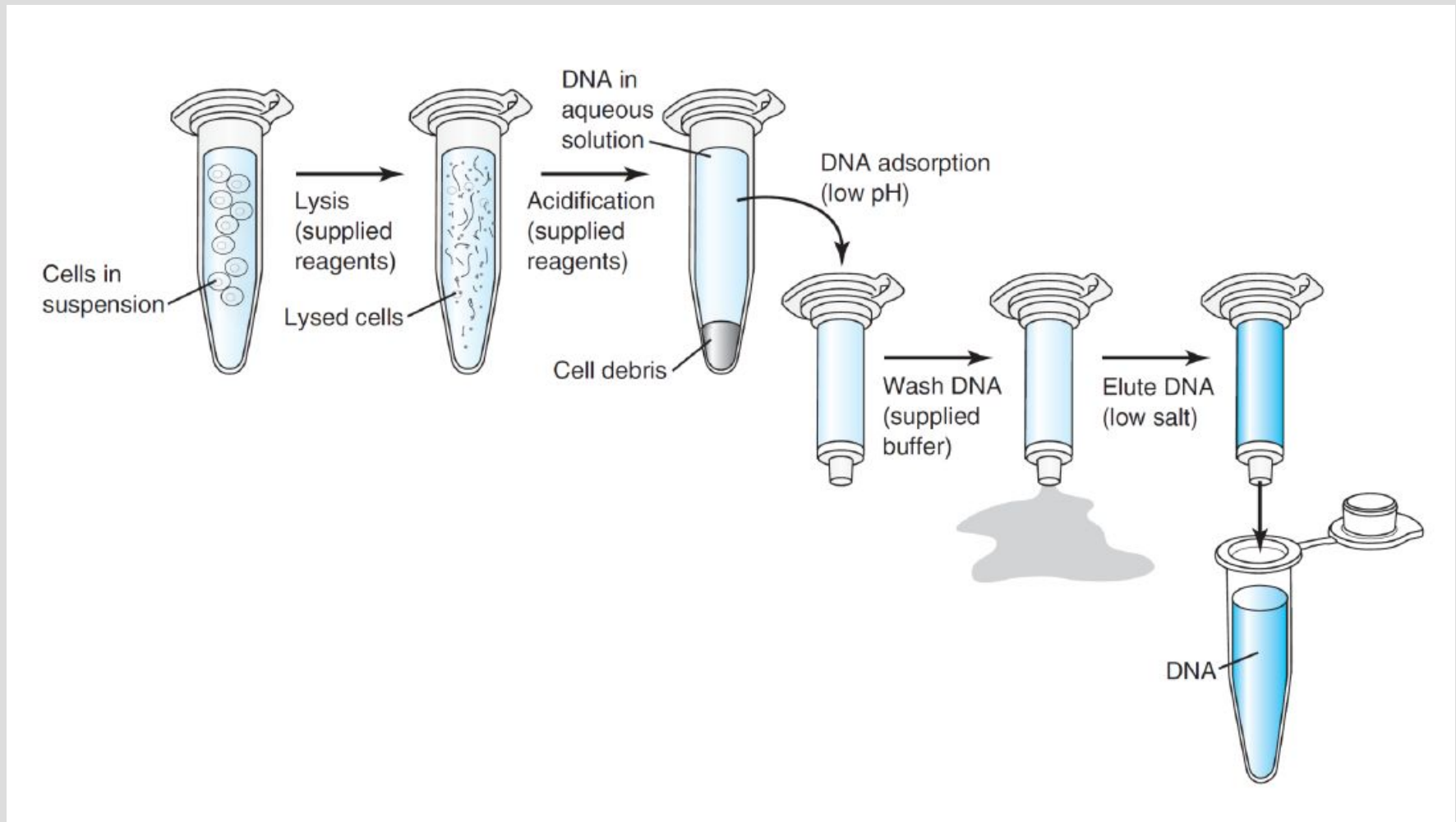
Преимущества и недостатки метода выделения простым осаждением

- **Преимущества:**
 - по качеству выделения сопоставим с ФХЭ
 - не требует использования токсичных веществ
 - не занимает много времени
- **Недостатки:**
 - не является стандартным

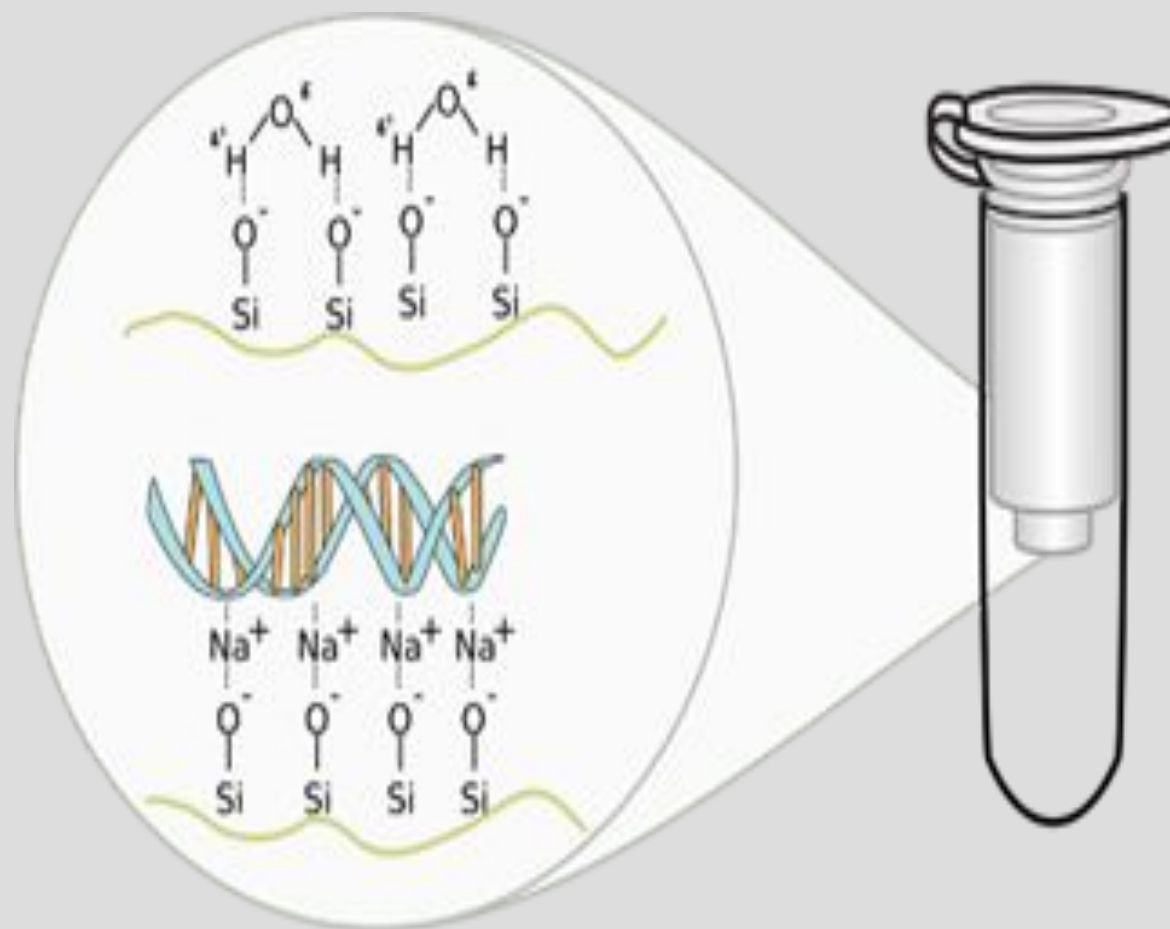
Выделение ДНК на частицах силикагеля



Выделение ДНК на колонках



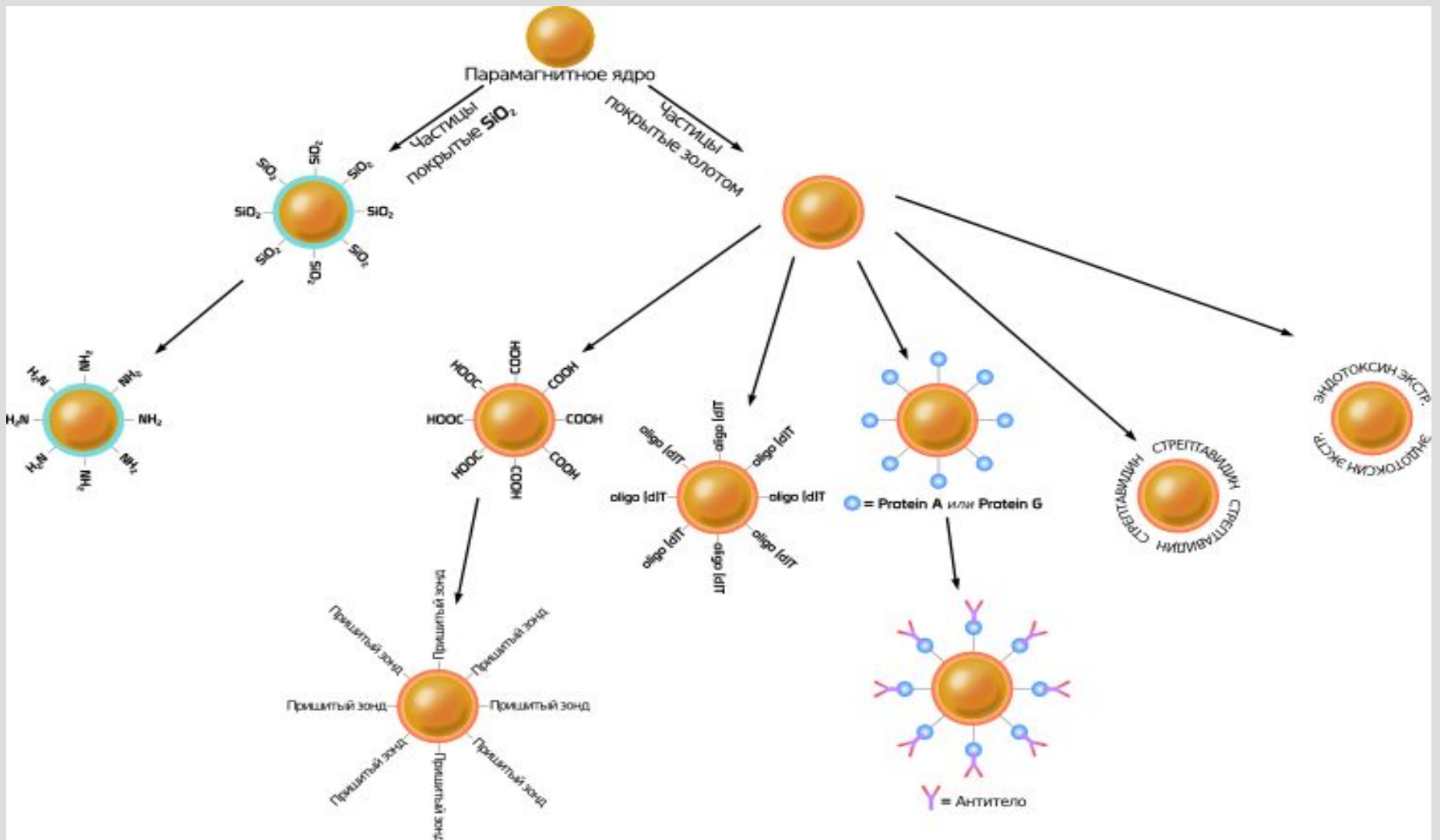
Связывание ДНК на поверхности колонки



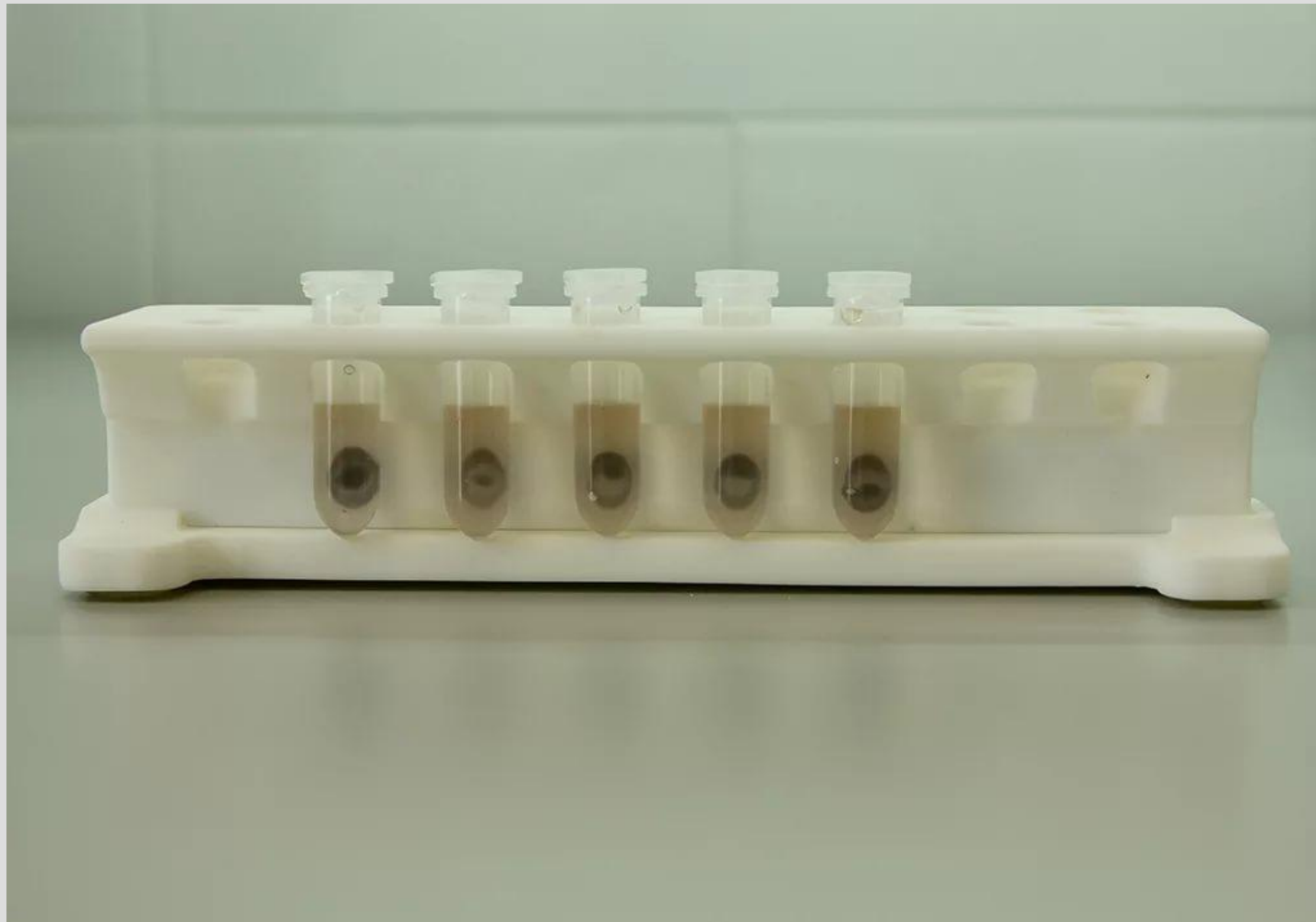
Выделение ДНК с использованием магнитных частиц



Варианты магнитных частиц



Магнитный штатив



Преимущества и недостатки метода выделения на сорбенте (частицы силикагеля, колонки, магнитные частицы)

- **Преимущества:**
- сравнительно быстрый метод
- нет токсичных соединений

- **Недостатки:**
- малый выход ДНК
- низкая чувствительность

Параметры оценки качества выделения ДНК

- 1. Количество выделенной ДНК (концентрация)
 - – спектрофотометр
 - – флюориметр
- 2. Качество ДНК:
 - а). Наличие примесей (чистота ДНК)
 - – спектрофотометр
 - – флюориметр
 - б). Длина выделенных фрагментов
 - – гель-электрофорез

Спектрофотометр

- Спектрофотометр измеряет отношение интенсивностей падающего на вещество (раствор) и прошедшего через него потоков света определённой длины волны. Десятичный логарифм этого отношения – **оптическая плотность (A или OD)**



Спектрофотометрия: оценка концентрации ДНК

- $C \text{ (мкг/мл)} = A_{\lambda} * K$

- C – концентрация вещества (ДНК) в растворе
- A_{λ} – оптическая плотность растворённого вещества при длине волны λ (для ДНК и РНК $\lambda=260$ нм)
- K – коэффициент, учитывающий поглощение света данной длины волны данным веществом, а также длину на которой происходит поглощение (размер кюветы)
- K (дцДНК) = 50
- K (оцДНК) = 37
- K (оцРНК) = 40

Оценка содержания примесей и чистоты ДНК

- Содержание примесей оценивается по величине отношения поглощения света при разных длинах волн:
 - 260 нм – поглощают дцДНК, оцДНК, оцРНК
 - 280 нм – поглощают белки
 - 230 нм – поглощают другие органические молекулы (ЭДТА, хаотропы, фенол)
-
- $A_{260}/A_{280} = 1,8-1,9$ – чистая ДНК
 - $A_{260}/A_{230} = 2,0-2,2$ – чистая ДНК

Флюориметрическое (спектрофлюориметрическое) определение концентрации ДНК

- К исследуемому образцу добавляют специфический флюорохром и определяют интенсивность флюоресценции при облучении светом соответствующей длины волны.

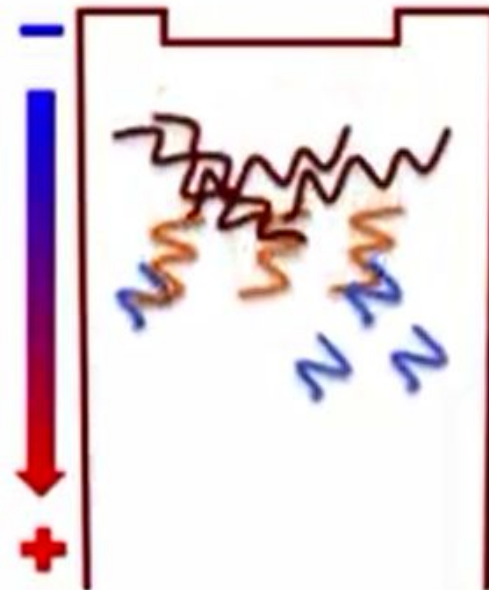
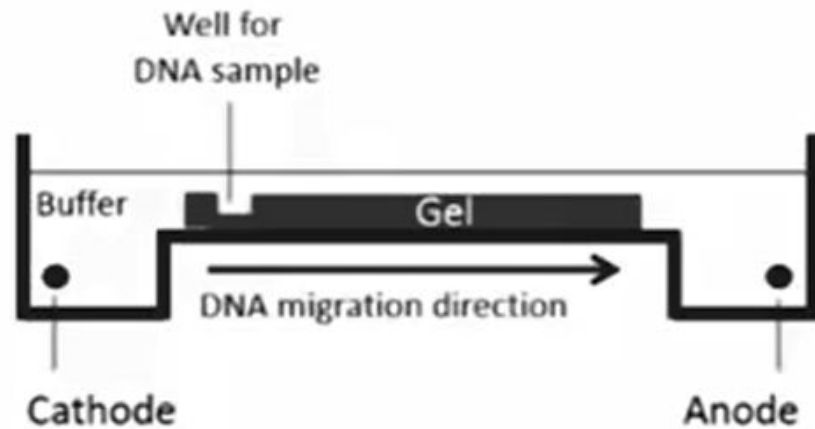


Преимущества и недостатки флюориметрии по сравнению со спектрофотометрией

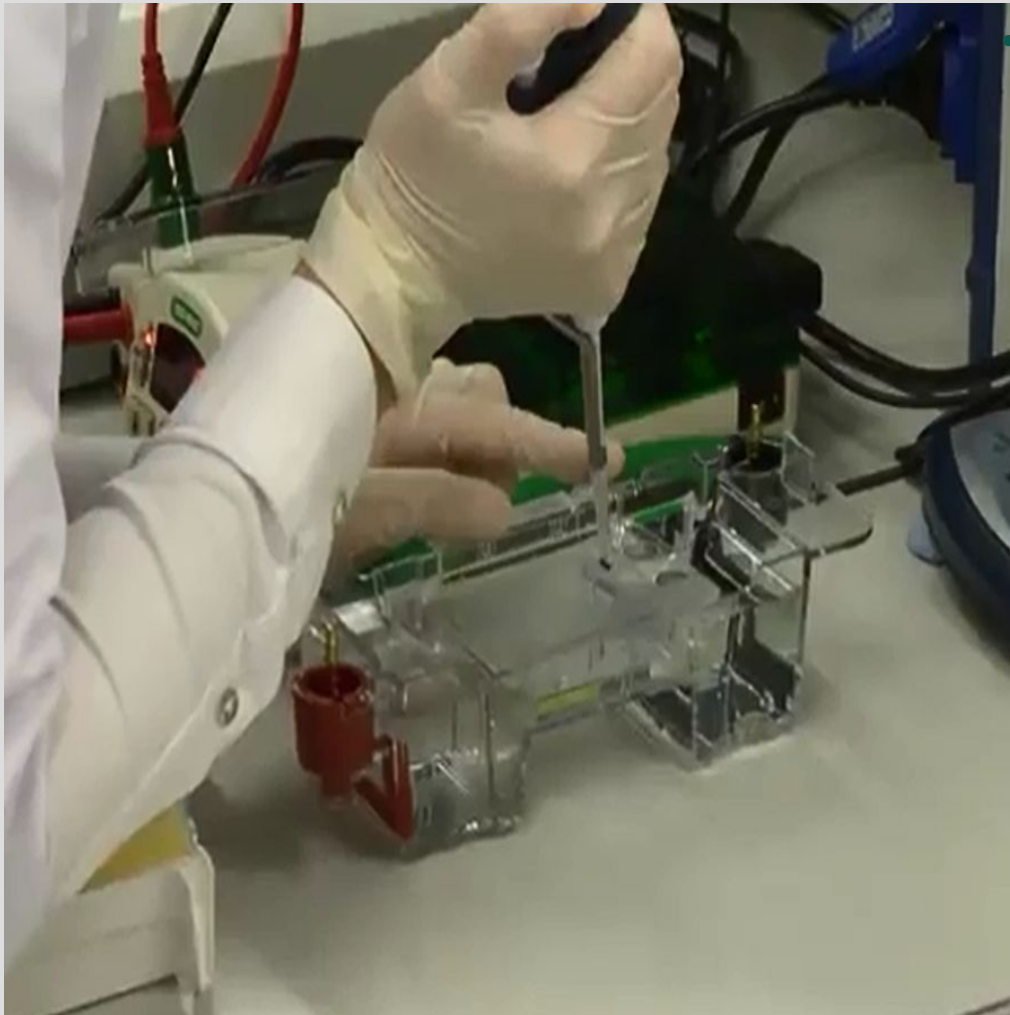
- Преимущества:
- высокая селективность (за счёт специфичного связывания флюорохрома)
- высокая чувствительность (0,01 мкг/мл против 0,1 мкг/мл)
- точность измерения равномерна на всём диапазоне измерений (нет необходимости в повторях)
- Недостатки:
- сложность в измерении содержания примесей (для каждого вещества нужен свой флюорохром)

Принцип гель-электрофореза НК

Electrophoresis in agarose gel

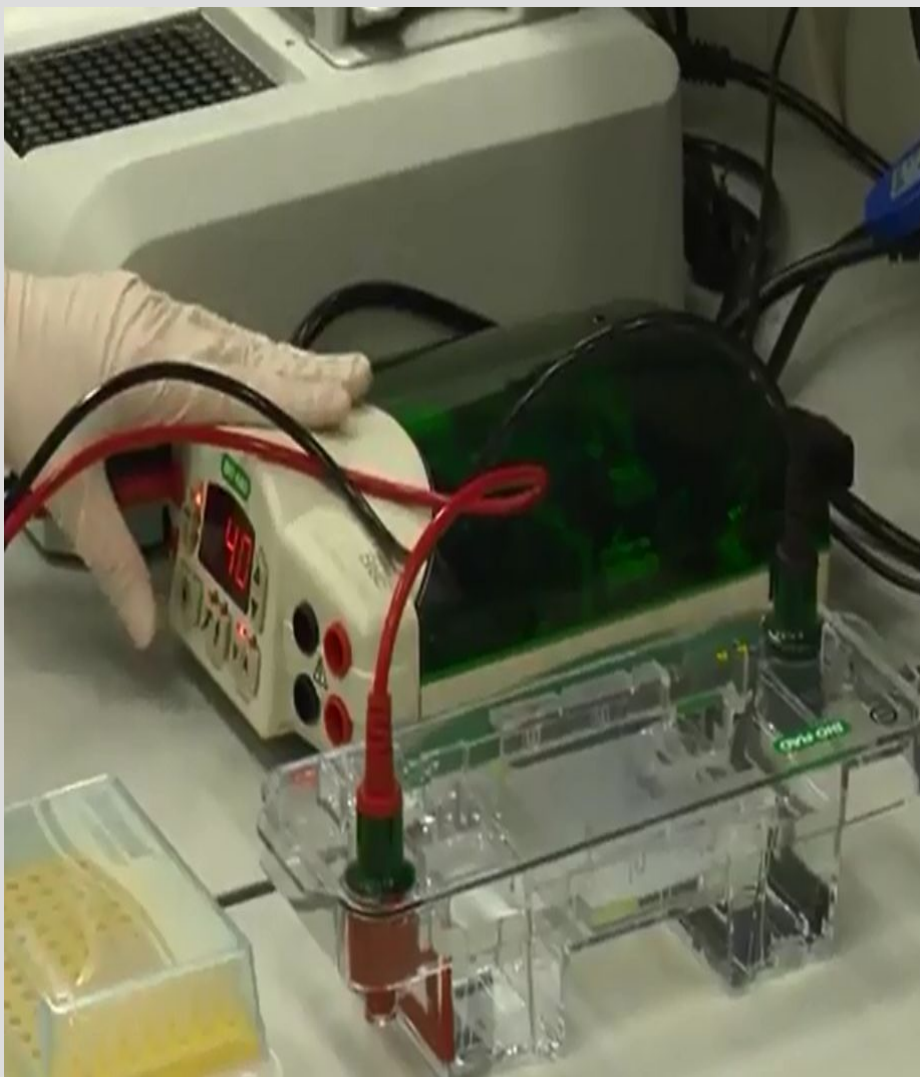


Электрофорез: 1. Внесение образца ДНК в лунку геля



Пластины агарозного геля кладут в камеру для фореза. К образцу ДНК добавляют интеркалирующий флюорохром и вносят образец в лунку геля. В соседнюю лунку помещают маркер молекулярных весов

Электрофорез: 2. Запуск электрофореза



Камеру для фореца закрывают крышкой, устанавливают режим (напряжение, время) электрофореза.

Электрофорез: 3. Просмотр в трансиллюминаторе



- Гель перемещают в трансиллюминатор, где происходит облучение геля ультрафиолетом. Результат оценивают визуально непосредственно или через систему фотодокументации.

Оценка качества ДНК по электрофореграмме

