

Министерство образования и науки Российской Федерации
Федеральное бюджетное государственное образовательное учреждение
высшего образования «Оренбургский государственный университет»
Химико-биологический факультет
Кафедра биохимии и микробиологии

Методы выделения и очистки ДНК

*Лабораторная работа №7
по «Генетике прокариот»*

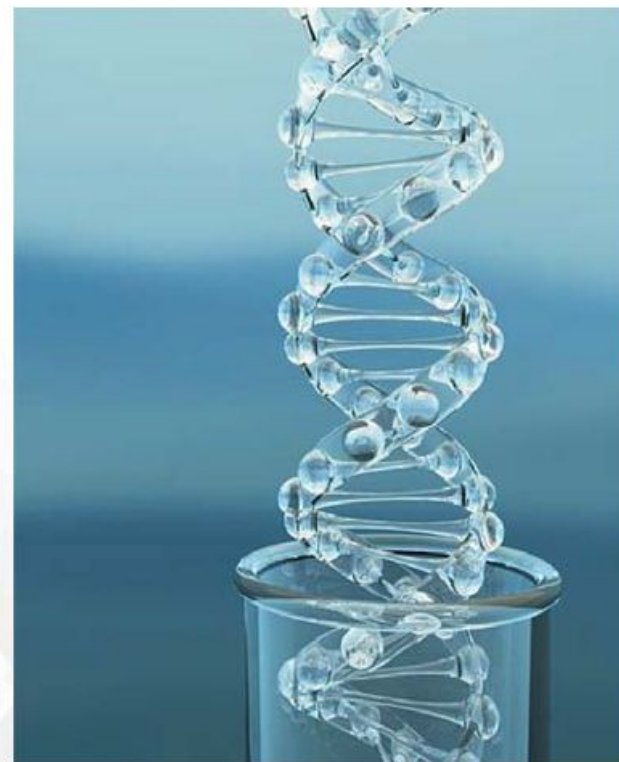
Давыдова Ольга Константиновна, к.б.н., доцент

План:

- Параметры выделения ДНК
- Выделение ДНК из бактериальных клеток
 - Фенольный метод
 - Щелочной метод
- Выделение с использованием сорбентов
 - Выделение на микроколонках

Методы выделения ДНК различаются :

- а) чистотой конечного продукта
- б) временем, необходимым для его получения
- в) применимостью для выделения больших (или, напротив, меньших) количеств продукта



Выход ДНК зависит от фазы роста

- Выход из культур, находящихся в стационарной фазе часто оказывается ниже, чем из культур в логарифмической фазе



В зависимости от природы клеточной стенки бактерии могут быть разрушены:

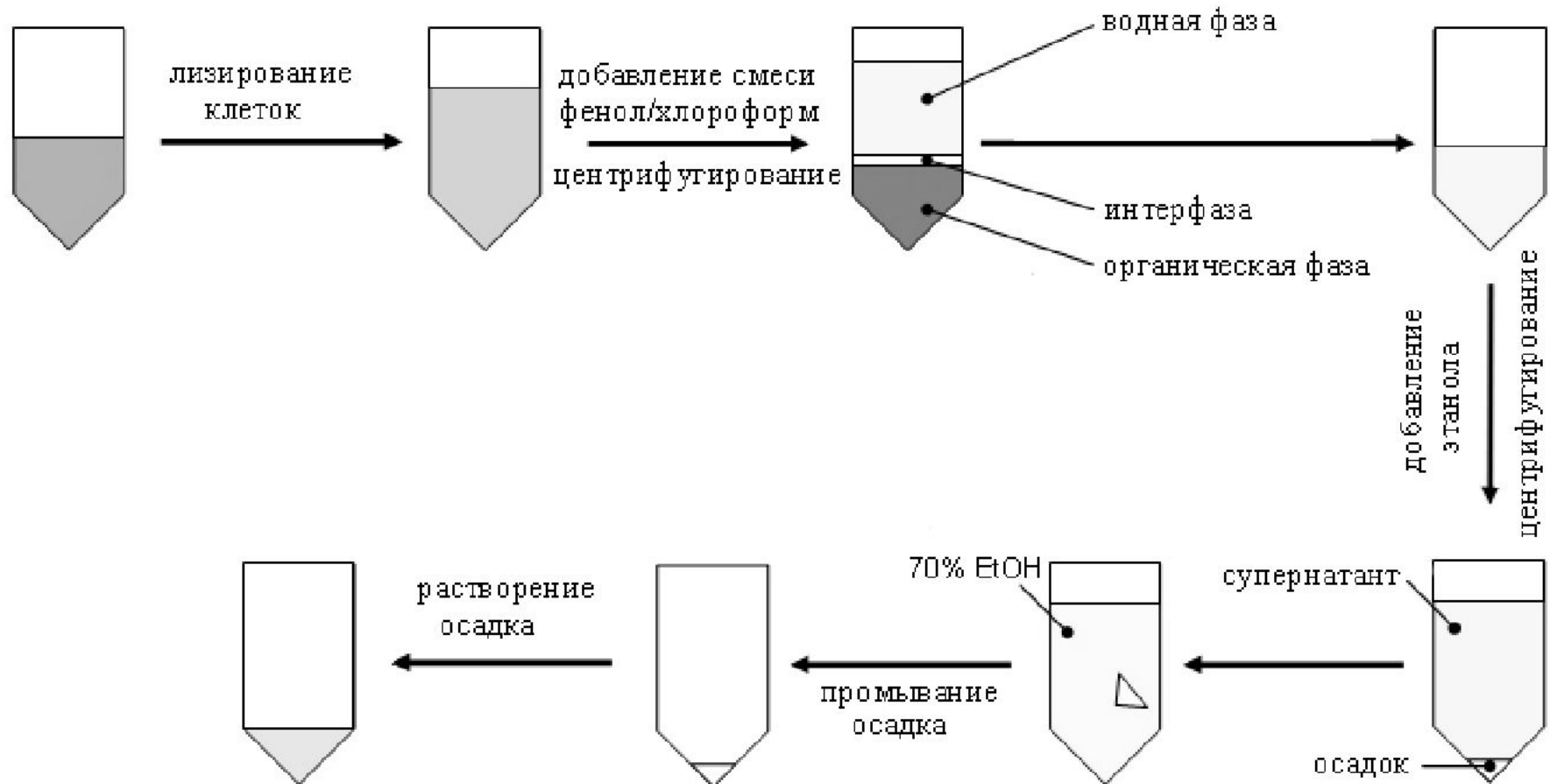
- 1) с помощью одного лишь детергента
 -
- 2) с использованием сочетания действия детергентов и гидролитических ферментов или
- 3) с помощью физических методов, таких как разрушение под действием ультразвука, в результате резкого изменения давления или при встряхивании со стеклянными шариками



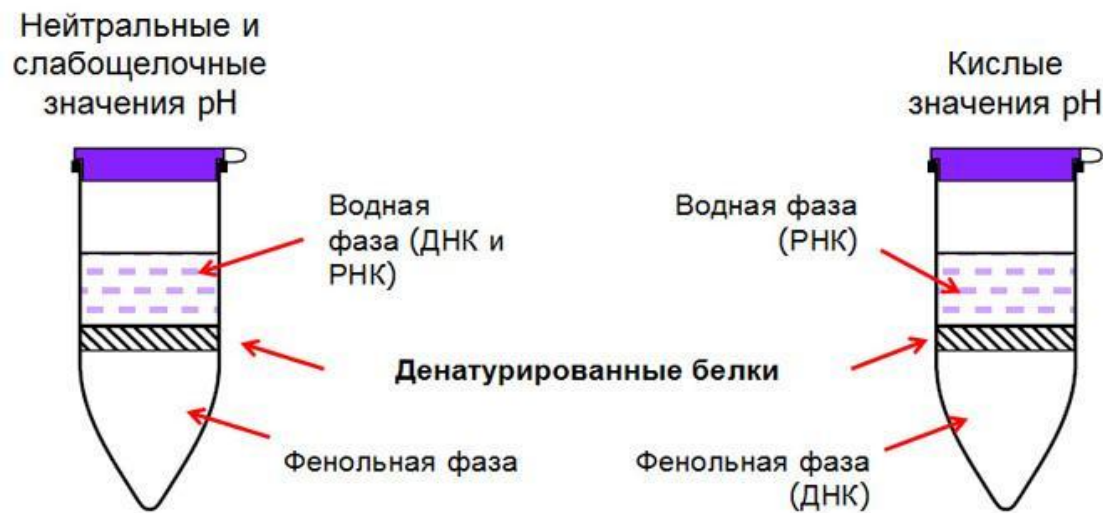
Методы очистки ДНК

- После лизиса клеточного материала образуется мультикомпонентная смесь, содержащая, в том числе, ДНК. В связи требуется очистка целевой ДНК:
 - 1) Очистка раствора с помощью **методов органической экстракции** (с помощью фенола, хлороформа) с последующим осаждением ДНК спиртами и растворением в воде
 - 2) **Дифференциальная сорбция ДНК на твердом носителе** (чаще всего силикагели с повышенным отрицательным зарядом или модифицированной поверхностью), после нескольких стадий отмывки сорбента с локализованной на его поверхности ДНК органическими растворителями ДНК смывается водой

Метод фенол-хлороформной экстракции ДНК

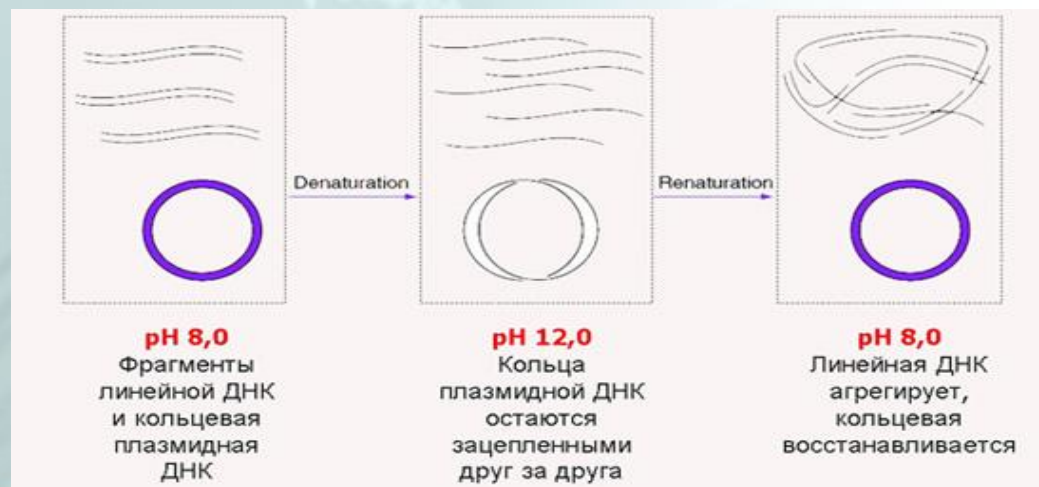


- Белки экстрагируют смесью фенола, хлороформа, изоамилового спирта. Поскольку плотности этих органических растворителей отличны от плотности воды, при центрифугировании лизата клеток, к которому были добавлены фенол и хлороформ, образуется два отдельных слоя: нижний, представляющий собой раствор на основе органических растворителей, и верхний, содержащий водный раствор. При этом белки денатурируют и образуют преципитат, который располагается узкой полосой на границе водной и органической фаз.
- Если фенол был уравновешен буфером с нейтральным значением рН, то водная фаза будет содержать сразу и ДНК, и РНК.
- Если же фенол был уравновешен буфером, имеющим кислое значение рН, то ДНК окажется в нижнем, органическом слое, а РНК - в верхнем, водном.
 - Далее используют осаждение ДНК этанолом (изопропанолом).

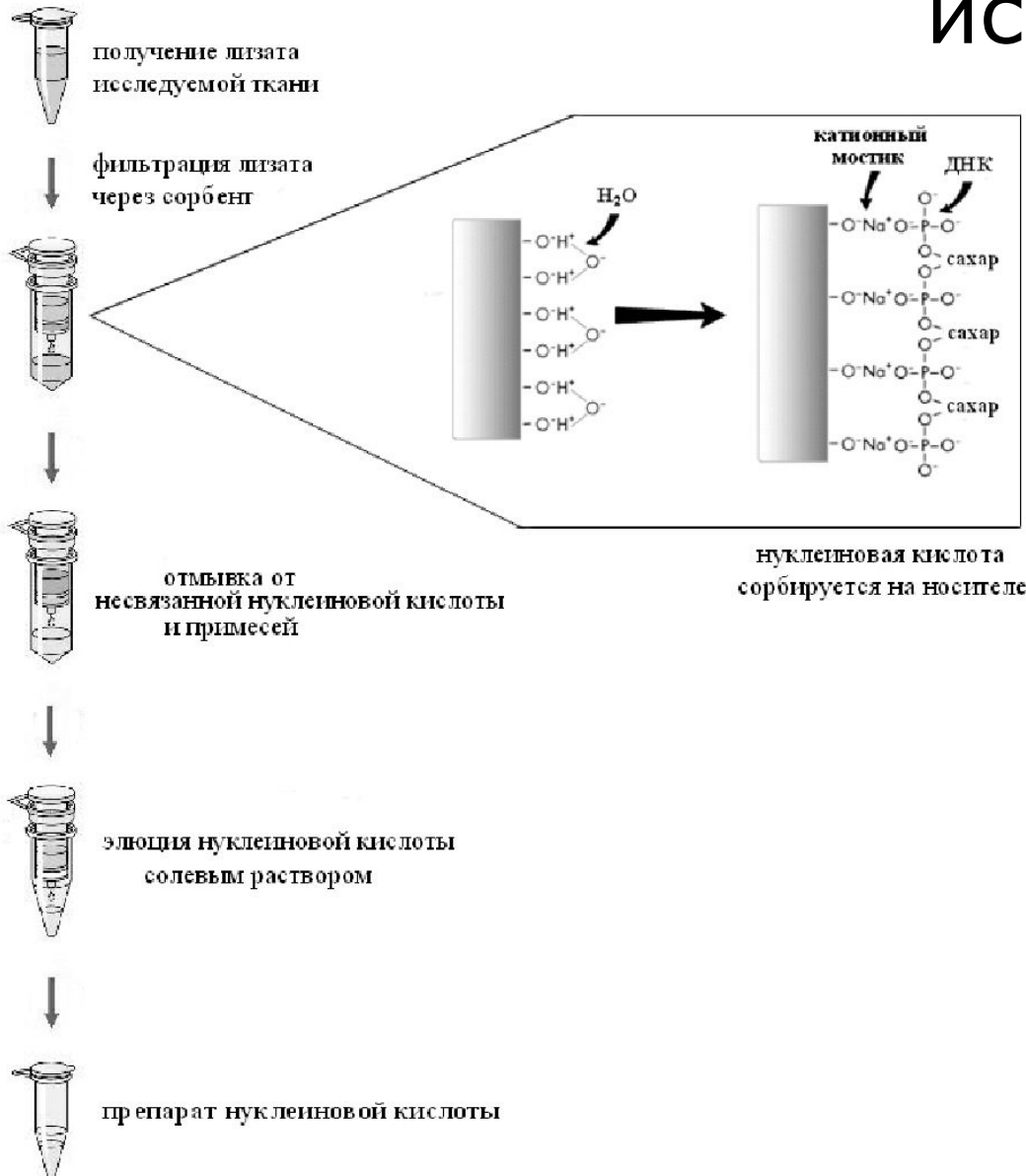


Щелочной метод выделения плазмидной ДНК

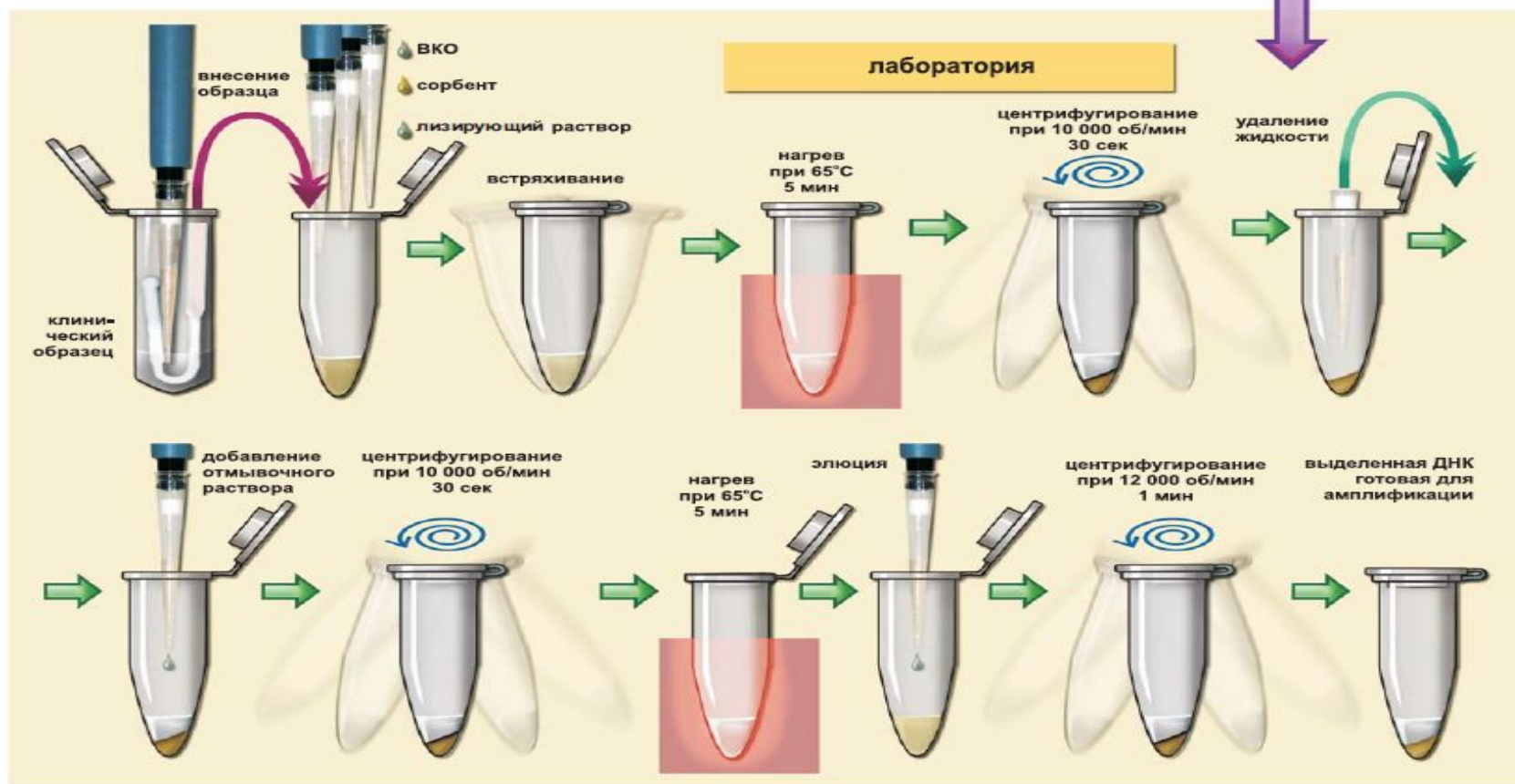
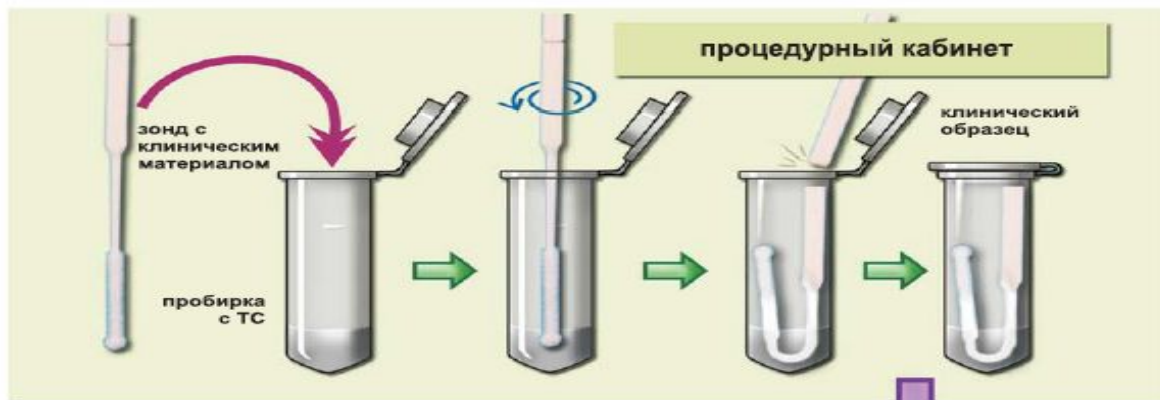
- В ходе эксперимента изменяют рН раствора, содержащего геномную и плазмидную ДНК, на щелочной. При таком значении рН вся ДНК денатурирует. Однако цепи двуцепочечной плазмидной ДНК при этом остаются связанными друг с другом, поскольку плазмиды имеют кольцевую форму. При дальнейшей ренатурации, которая инициируется изменением рН раствора до первоначального, длинные цепи геномной ДНК, успев разойтись в растворе при денатурации, образуют плотный неструктурированный комок, а цепи плазмидной ДНК успешно восстанавливают исходную структуру. Теперь плазмидную ДНК легко отделить от геномной ДНК в ходе центрифугирования.



Выделение ДНК с использованием сорбентов



Обработка
24 клинических
образцов занимает
40-50 минут



Выделение ДНК на микроколонках



-
- Экстракция ДНК в домашних условиях

<http://www.examen.ru/add/School-Subjects/Natural-Sciences/Genetics/7672/7694>

- Лаборатория в домашних условиях

<http://www.vokrugsveta.ru/vs/article/7872/>

- Биохакинг

- <http://theoryandpractice.ru/posts/7618-biokhacking>