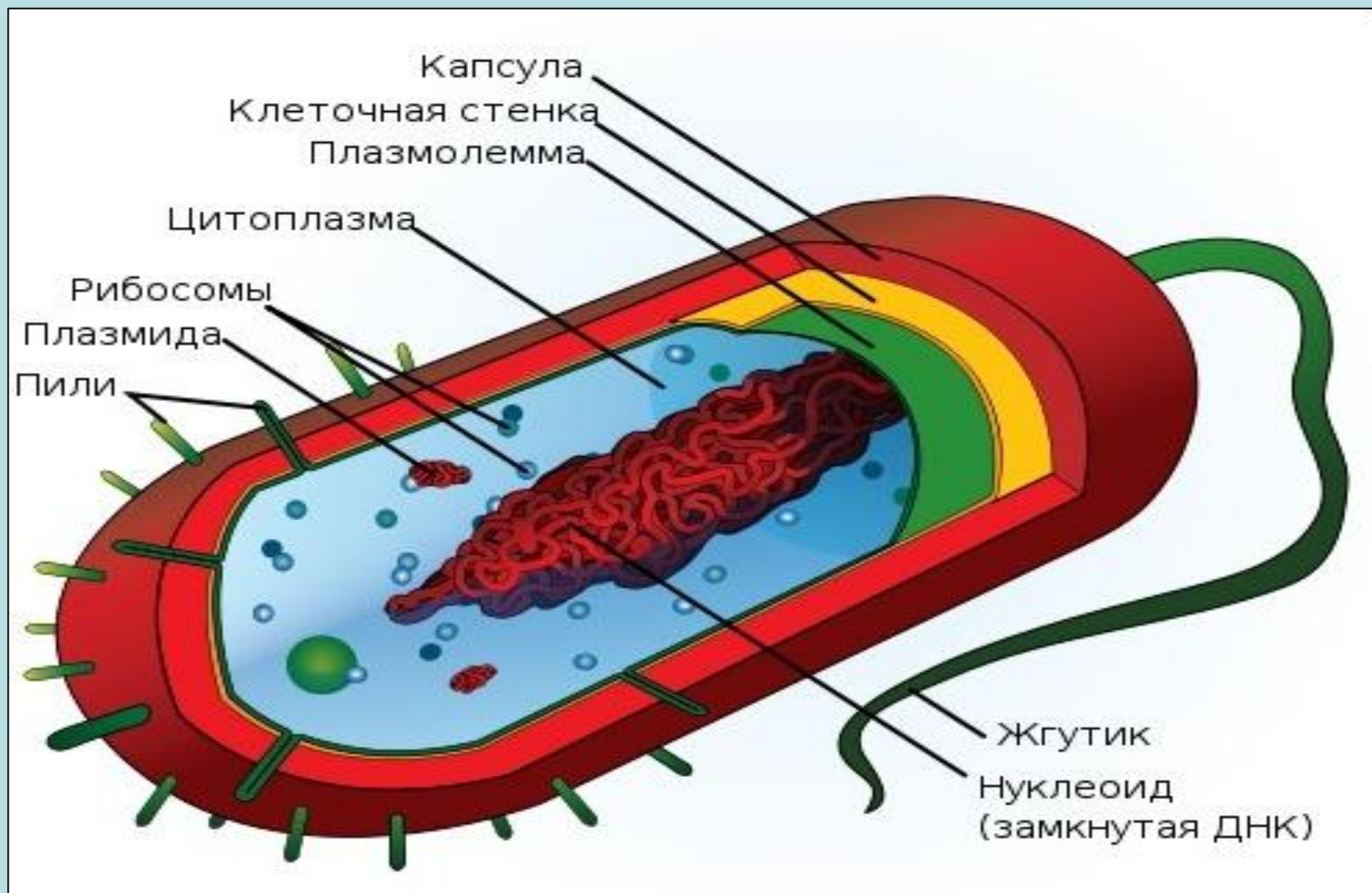


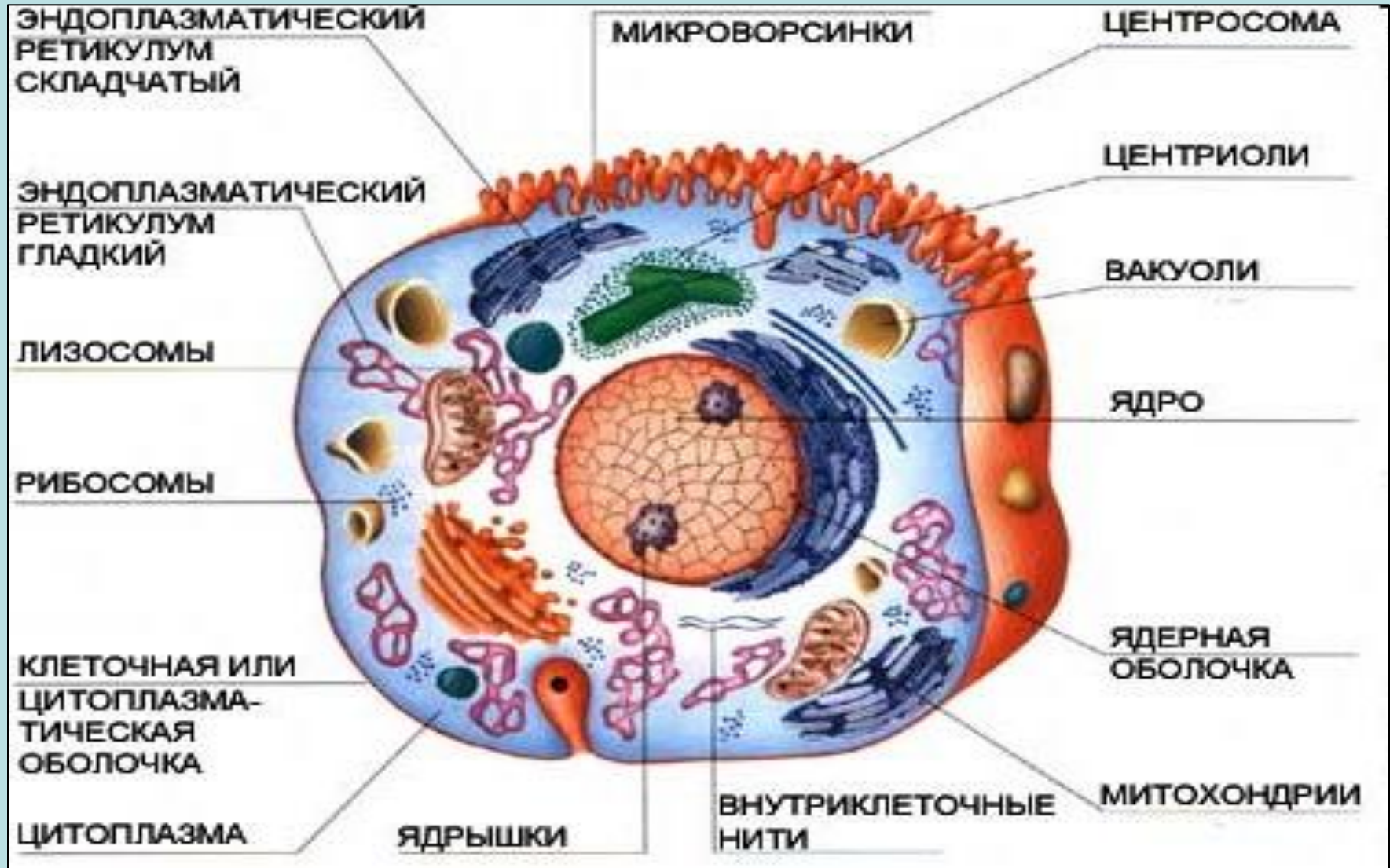


***Методы выделения нуклеиновых
кислот***

Геномный материал прокариот

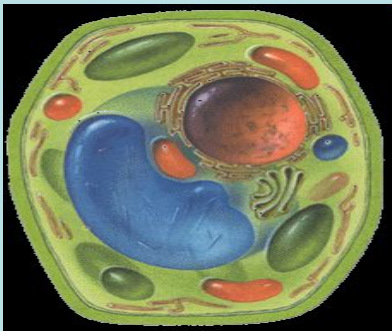


Геномный материал эукариот



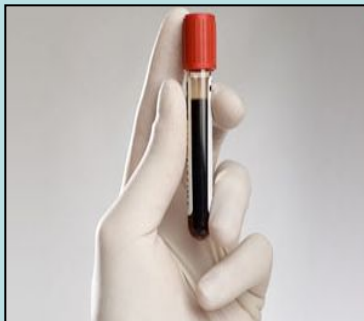
Основные этапы выделения ДНК из биологических образцов

1. Получение биологического образца
2. Разрушение клеточной стенки, капсулы, биологических мембран
3. Удаление белков (депротеинизация)
4. Очистка, переосаждение, растворение ДНК
5. Проверка качественного и количественного выхода ДНК



1. Получение биологического образца (клеток, содержащих генетический материал)

- Венозная кровь – центрифугирование образца и отбор ядросодержащих клеток



- Культура клеток в среде – центрифугирование, отбор питательной среды (для культур бактерий, выращенных в жидкой среде); отделение клеток от подложки, центрифугирование (для культур эукариотических клеток)

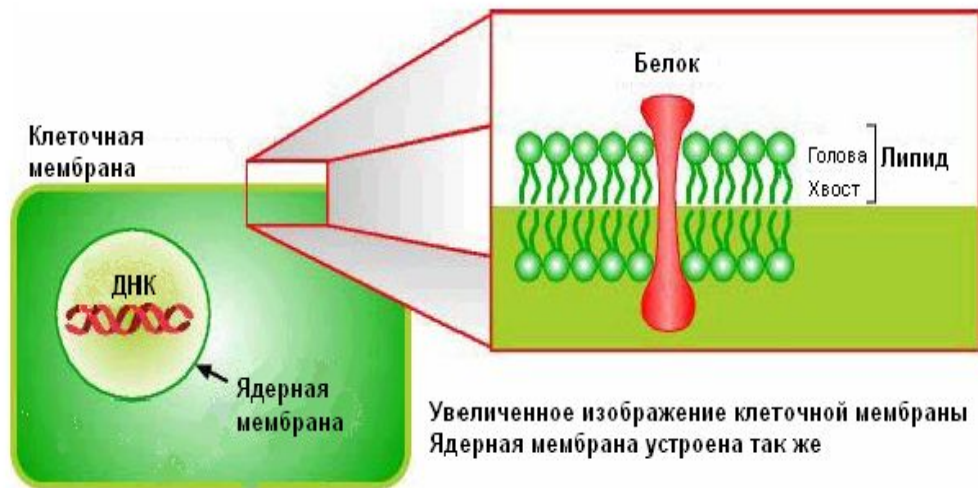


- Бактериальная культура на чашке Петри – забор материала при помощи микробиологической петли



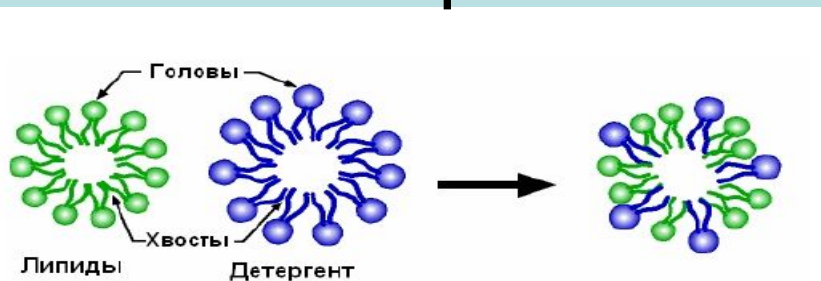
2. Разрушение клеточной стенки, капсулы, биологических мембран

Строение биологической мембраны



Увеличенное изображение клеточной мембраны
Ядерная мембрана устроена так же

Солюбилизация мембраны



Tris-HCl – поддержание постоянства pH (необходимо для работы лизоцима, а также для сохранения целостности ДНК)

ЭДТА – хелатирующий агент (связывает двухвалентные ионы, в т.ч. ионы Mg^{2+}

– кофакторы ДНКаз)

Детергент

(тритон X -100,СТАВ, SDS) – солюбилизация мембраны, денатурация белков

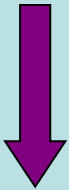
Дополнительно:

Лизоцим – мурамидаза, осуществляет гидролиз пептидогликана клеточной стенки бактерий муреина

Нагрев до $65^{\circ}C-90^{\circ}C$

3. Депротейнизация

Удаление белков



Протеиназа К – удаления белковой примеси в препаратах нуклеиновых кислот, расщепление и инактивация нуклеаз в препаратах ДНК, устойчива ко многим денатурирующим агентам, таким как додецил-сульфат натрия и мочевины, повышающим доступность пептидных связей белков для протеиназы К



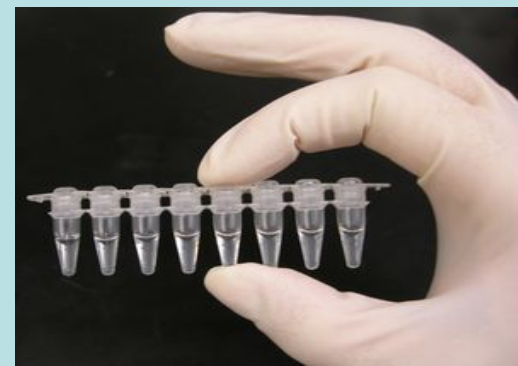
Денатурация



Необратимое осаждение связано с глубокими внутримолекулярными изменениями структуры белка, что приводит к потере им нативных свойств (растворимости, биологической активности и др.). Денатурация белков при помощи фенола (рН 7,5) с последующим его удалением смесью фенол-хлороформ, хлороформом

4. Переосаждение и растворение ДНК

- Освобождение нуклеиновых кислот от детергента, солей
- Используют AcNa + изопропиловый спирт или AcNa + 96% этиловый спирт – образование осадка нуклеиновых кислот
- 70% этанол – дополнительная промывка образовавшегося осадка ДНК от солей
- Центрифугирование
- Растворение ДНК в ddH₂O
- Хранить при -20⁰C



Подведение итогов:

- Для выделения ДНК нужно получить лизат клеток, осветлить его центрифугированием (удаляем мембрану, клеточную стенку, капсулу)
- Очистить ДНК, поскольку в препарате могут содержаться ДНКазы, ингибиторы лигаз, рестриктаз, Taq-полимеразы

Очистка препарата ДНК

Потенциальные ингибиторы ПЦР

Ингибитор	Концентрация ингибитора
SDS	> 0.005%
Фенол	> 0.2%
Этанол	> 1%
Изопропанол	> 1%
Ацетат натрия	> 5 mM
Хлористый натрий	> 25 mM
EDTA	> 0.5 mM
Гемоглобин	> 1 мг/мл
Гепарин	> 0.15 i.m/ мл
Мочевина	> 20 mM
Реакционная смесь	> 15%

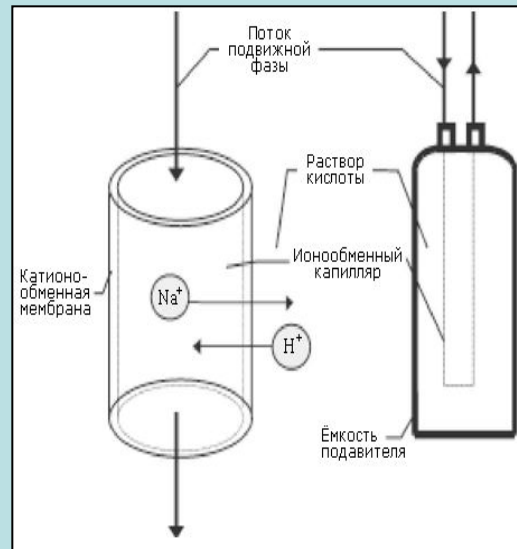
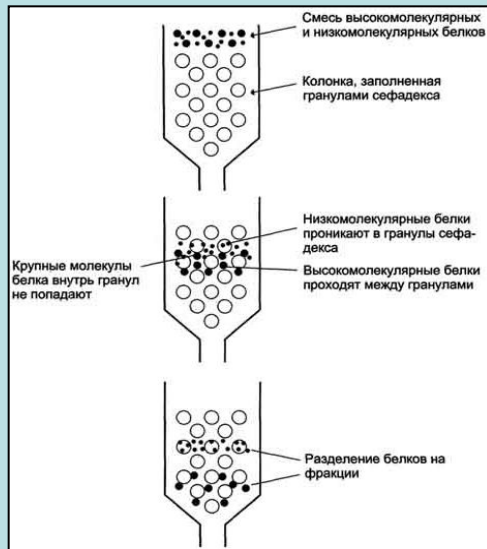
Методы очистки нуклеиновых кислот

1. Фенол-хлороформная экстракция (удаление белков), спиртовое осаждение ДНК (изопропанол, этанол)
2. Хроматография (гель-фильтрация, ионообменная хроматография, селективная адсорбция) – метод часто используется в коммерческих наборах для выделения ДНК
3. Центрифугирование в градиенте хлористого цезия

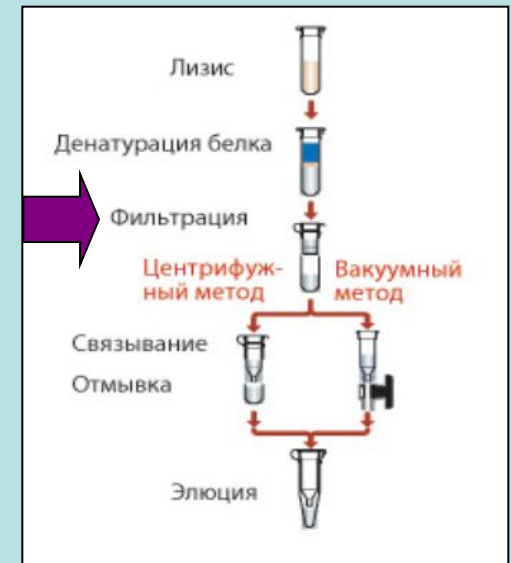
Хроматография

Ионно-обменная хроматография

Гель-фильтрация



Селективная адсорбция

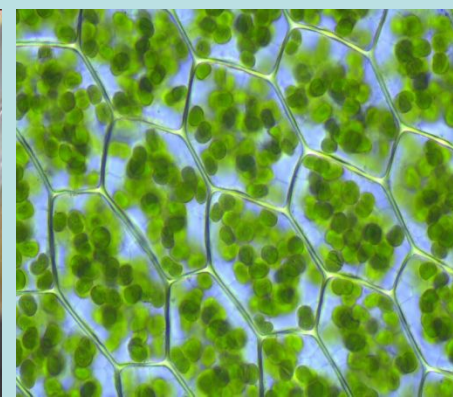
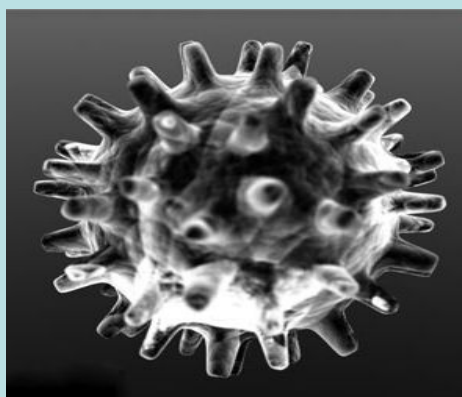
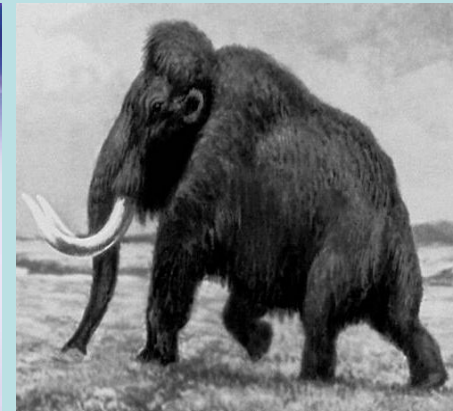
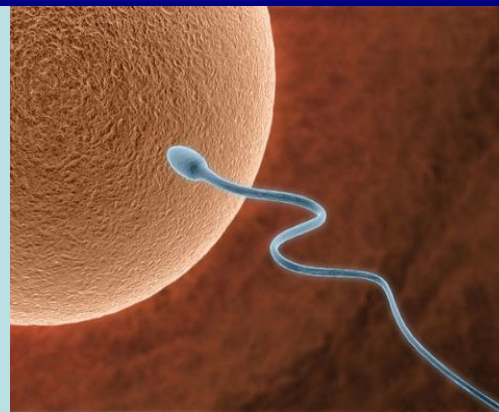
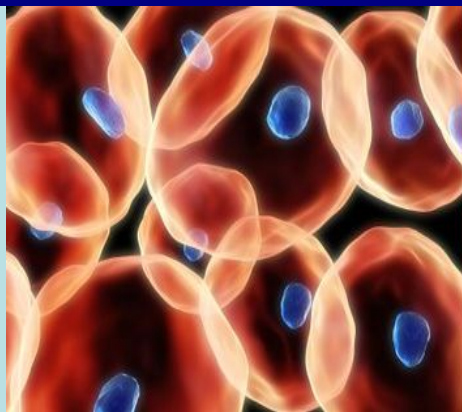


Аффинное связывание – использование биотин меченых праймеров, с последующей стрептовидиновой акцепцией ДНК

В чем различия между методами выделения геномной и плазмидной ДНК?

- Основные стадии – одинаковы (получение лизата, депротенинизация, преципитация ДНК)
- При выделении геномной ДНК используются более мягкие методы лизиса (НЕ используется нагревание, щелочной лизис) для сохранения целостности ДНК (геномная ДНК имеет большие размеры по сравнению с плазмидной, легко рвется при действии температуры, рН, при механическом воздействии)
- При выделении геномной ДНК следует избегать интенсивного пипетирования раствора ДНК, а также нельзя использовать узкие наконечники для пипеток
- Подсушивать препарат высокомолекулярной ДНК следует БЕЗ подогрева
- Растворять такой препарат следует аккуратно, без встряхивания пробирки

Виды биологических образцов



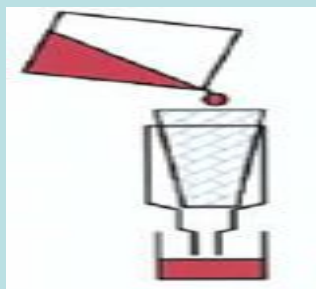
Выделение ДНК из различных объектов

- Варьируют методики лизиса (использование дополнительных ферментов, подбор детергента). Пример:
 - для выделения ДНК из грибов и растений используют СТАВ (цетилтриметиламмоний бромид) – позволяет избавиться от полисахаридов и соединений фенольной природы – в буфере с низкой ионной силой преципитирует ДНК, в то время как полисахариды и фенольные соединения остаются в растворе

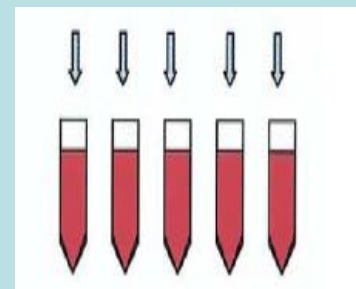
Метод иммуномагнитной сепарации



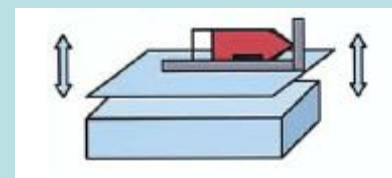
5-10 грамм кал
200 мл Hanks
буфер



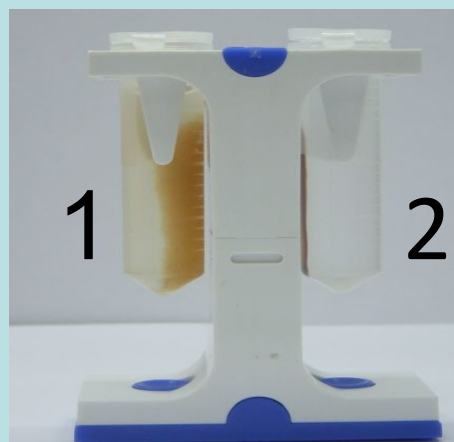
Фильтрация гомогенизата.
нейлоновый фильтр $d_{\text{поры}} = 220 \text{ мкм}$



Разделение гомогенизата.
5 порций по 40мл + 40мкл
ММС. Инкубация 30 мин.



Инкубация в магнитном
сепараторе на горизонтальной
платформе шейкера 15 мин



1 – ММС с колоноцитами после
конъюгации Ag(колоноцит)+Am
(ММС)

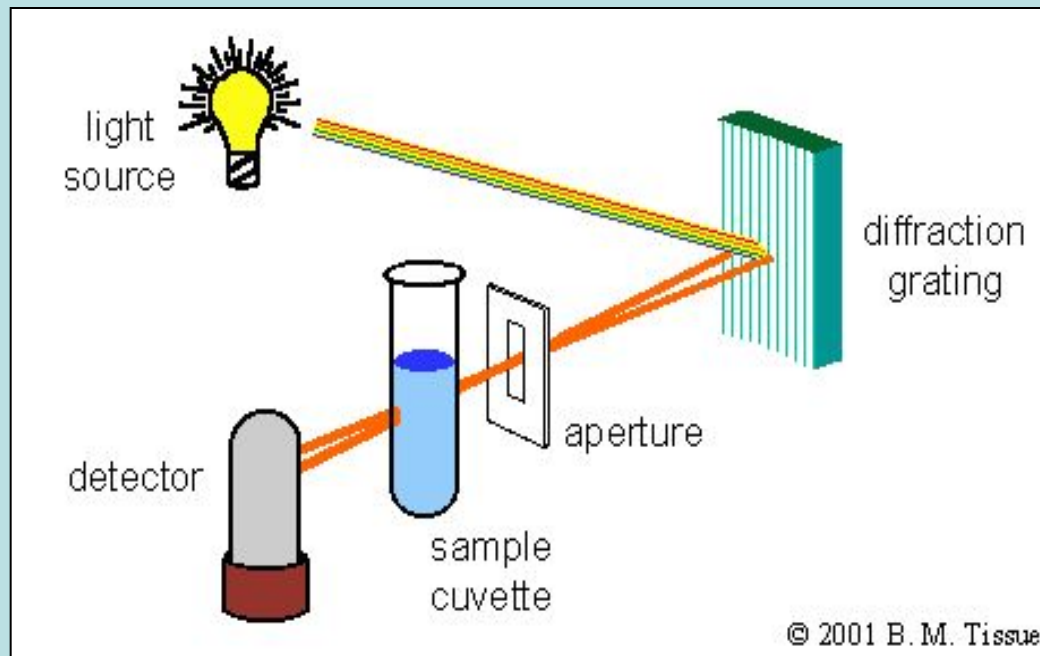
2 – ММС без колоноцитов

Выделение
ДНК из
колоноцитов

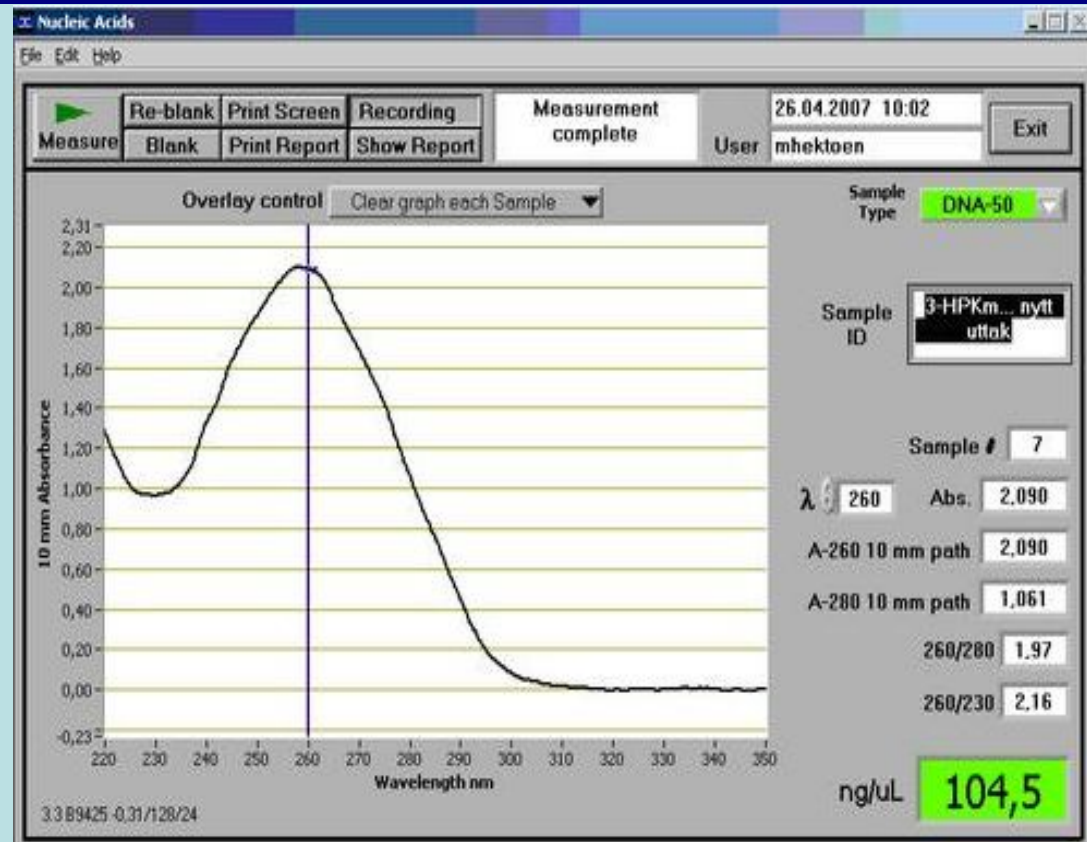
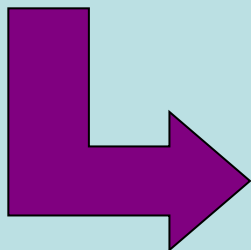
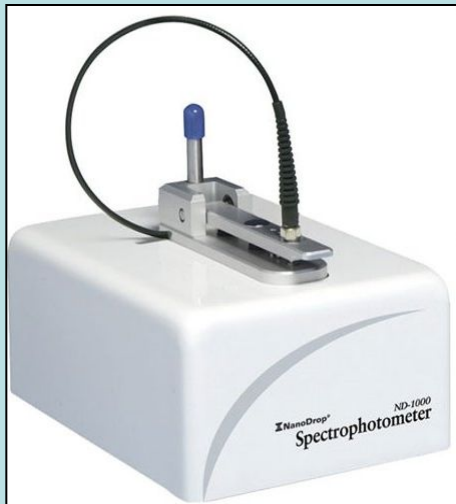


Проверка качественного и количественного выхода ДНК

1. Гель-электрофорез (агароза, ПААГ)
2. Спектрофотометрия

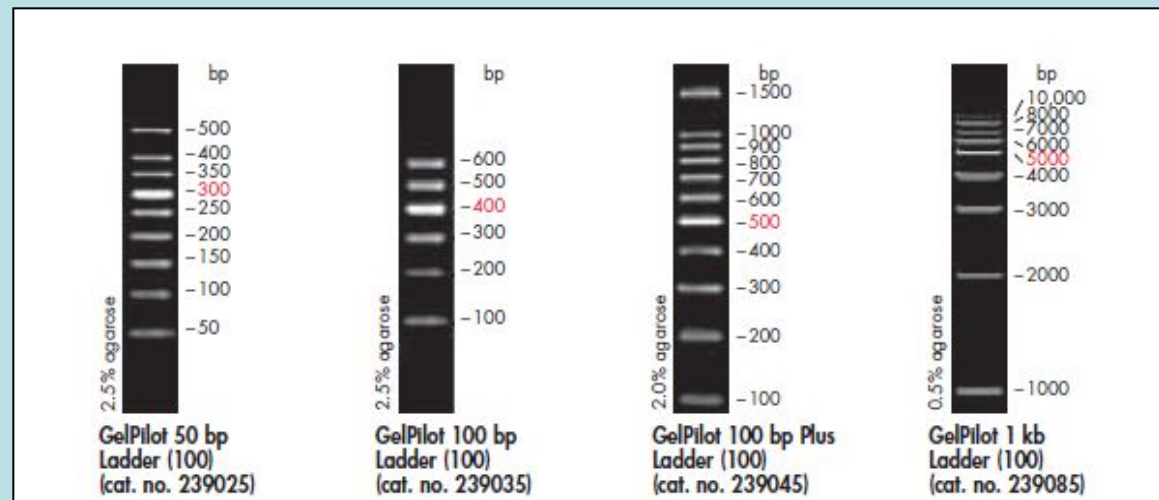
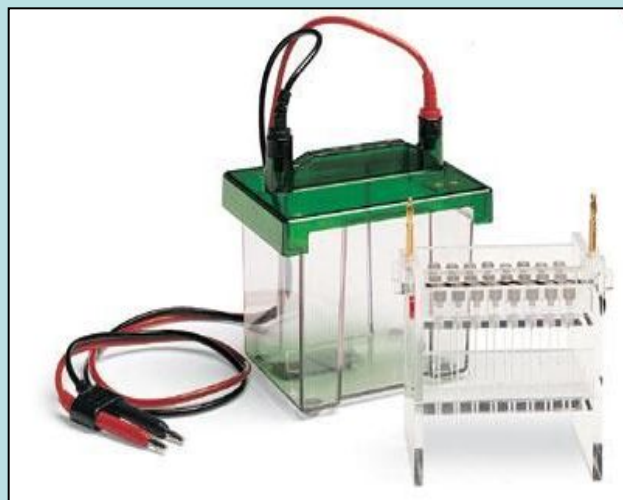
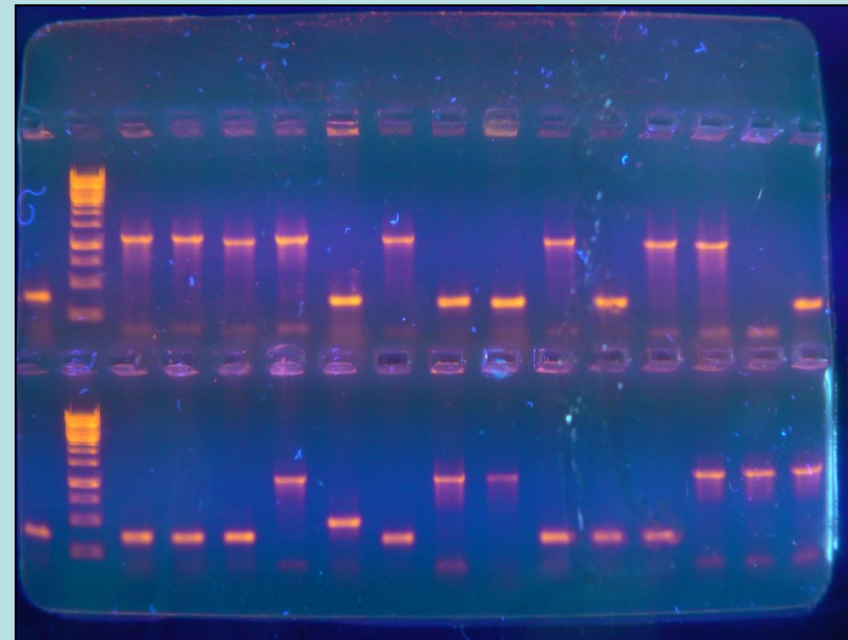
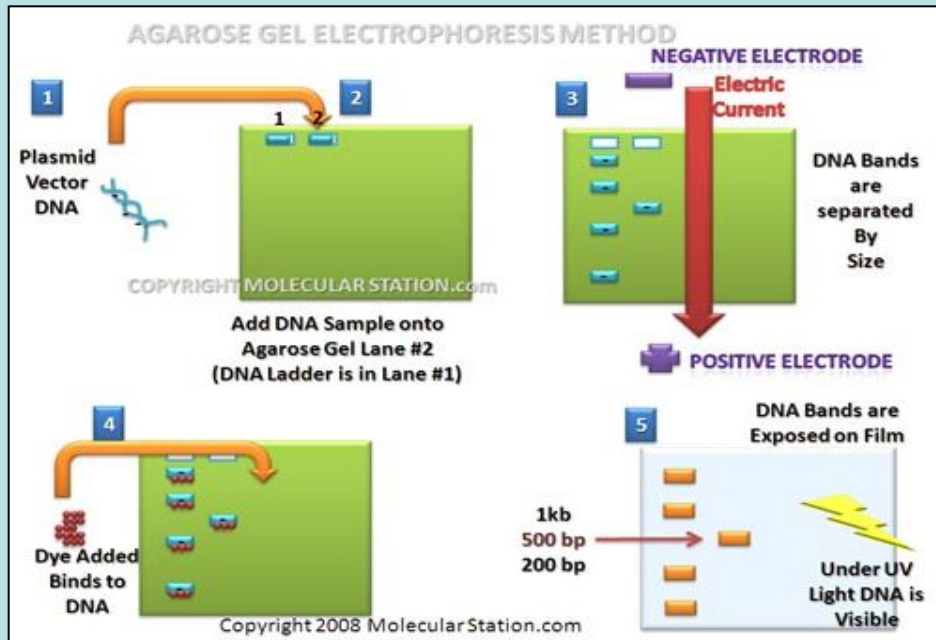


Спектрофотометрическое измерение концентрации ДНК



- Одноцепочечная ДНК: $c \text{ (пМол/мкл)} = A_{260} / 0.027$
 - Двухцепочечная ДНК: $c \text{ (пМол/мкл)} = A_{260} / 0.020$
 - Одноцепочечная РНК: $c \text{ (пМол/мкл)} = A_{260} / 0.025$
 - Олигонуклеотиды: $c \text{ (пМол/мкл)} = A_{260} / (1.5N_A + 0.71N_C + 1.20N_G + 0.84N_T)$
- где A_{260} - это величина поглощения, измеренная при 260 нм.

Гель-электрофорез





***А ТЕПЕРЬ
ВСЕ НА ПРАКТИКУМ!!!***