

Сбор биологического материала и выделение нуклеиновых кислот

Туранов С.В.

ИНЦМБ ДВО РАН

Лаб. Молекулярной систематики

Осень 2016

1. Сбор и хранение биологического материала.

2. Методы выделения и очистки нуклеиновых кислот.

1. Сбор и хранение биологического материала

Источники:

Ткань костных мышц, плавники, сердце, смывы, икра, чешуя, кровь и т.д.

Важно избежать:

1. Дегградации нуклеиновых кислот
2. Перекрёстной контаминации



Важно: избавиться от остатков фиксатора (спирта) перед началом выделения!

Выделение ДНК:

- Лизис ткани
- Очистка ДНК от других компонентов клетки
- Осаждение ДНК
- Растворение ДНК

Методы выделения ДНК:

- 1.Щелочной лизис.
- 2.Лизис с помощью протеиназы К.

Методы очистки ДНК:

- 1.Хлороформ-фенольный.
- 2.Колонки (коммерческие наборы).
- 3.Магнитные частицы (коммерческие наборы).
- 4.Сорбент (коммерческие наборы).

Методы осаждения ДНК:

1.Соль + спирт + центрифугирование.

Растворение ДНК:

1.Деионизированная вода.

2.Буфер для хранения (TE и др.)

Приборы и материалы для выделения ДНК

Перчатки, пробирки, автоматические дозаторы и наконечники к ним, центрифуга, термостат.

Протеиназа К, буфер для выделения, щелочной и нейтрализующий растворы, буфер для хранения ДНК.

Щелочной лизис

Ткань + Щелочь (Ph~12)



95°C (до 30 мин)



+ Нейтрализующий раствор



ДНК готова для ПЦР

Плюсы: цена и время, требуется малое кол-во ткани

Минусы: ДНК слабо очищена, фрагментирована, плохо хранится

Лизис с помощью протеиназы К

Ткань + Лизирующий буфер + Протеиназа К



37°C-56°C (от 4 ч. до «overnight»)



Переход к очистке (депротеинизации)

Плюсы:

качественный и
обстоятельный
лизис

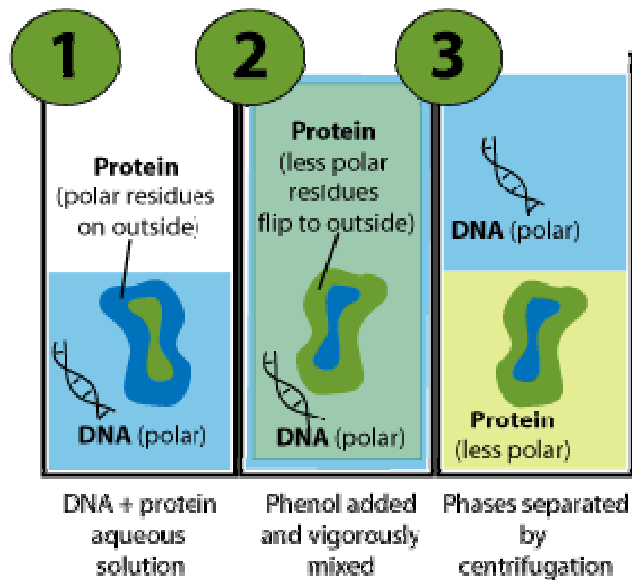
Минусы: время

Очистка (депротеинизация)

1. Хлороформ-фенольный метод
2. Колонки
3. Магнитные частицы

Очистка (депротеинизация)

Хлороформ-фенольный метод (с модификациями)



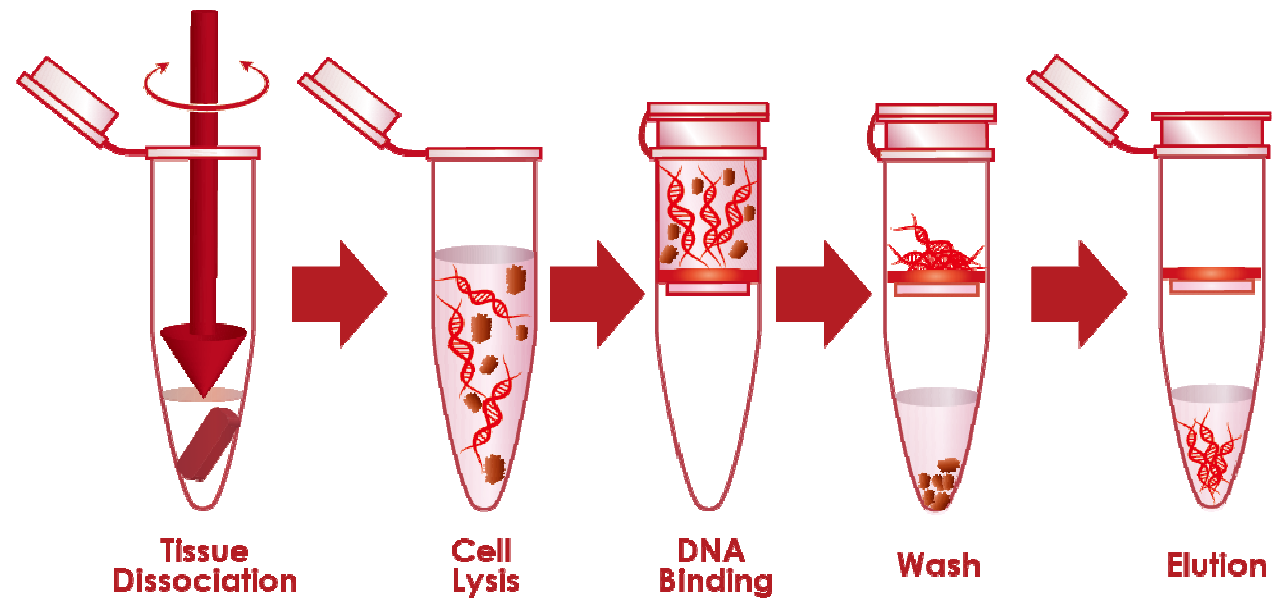
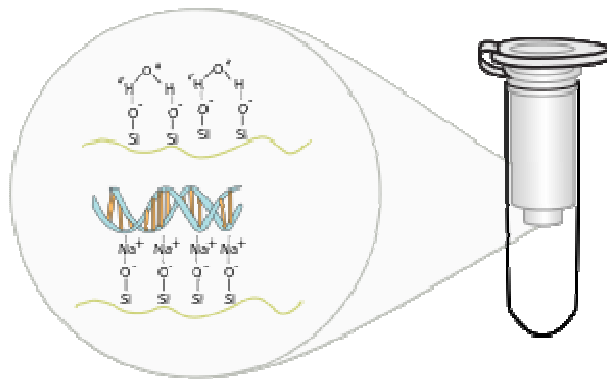
<http://bitesizebio.com/384/the-basics-how-phenol-extraction-works/>

Раствор после лизиса +
хлороформ + интенсивное
перемешивание ~ 10 мин. →
центрифугирование ~ 10 мин



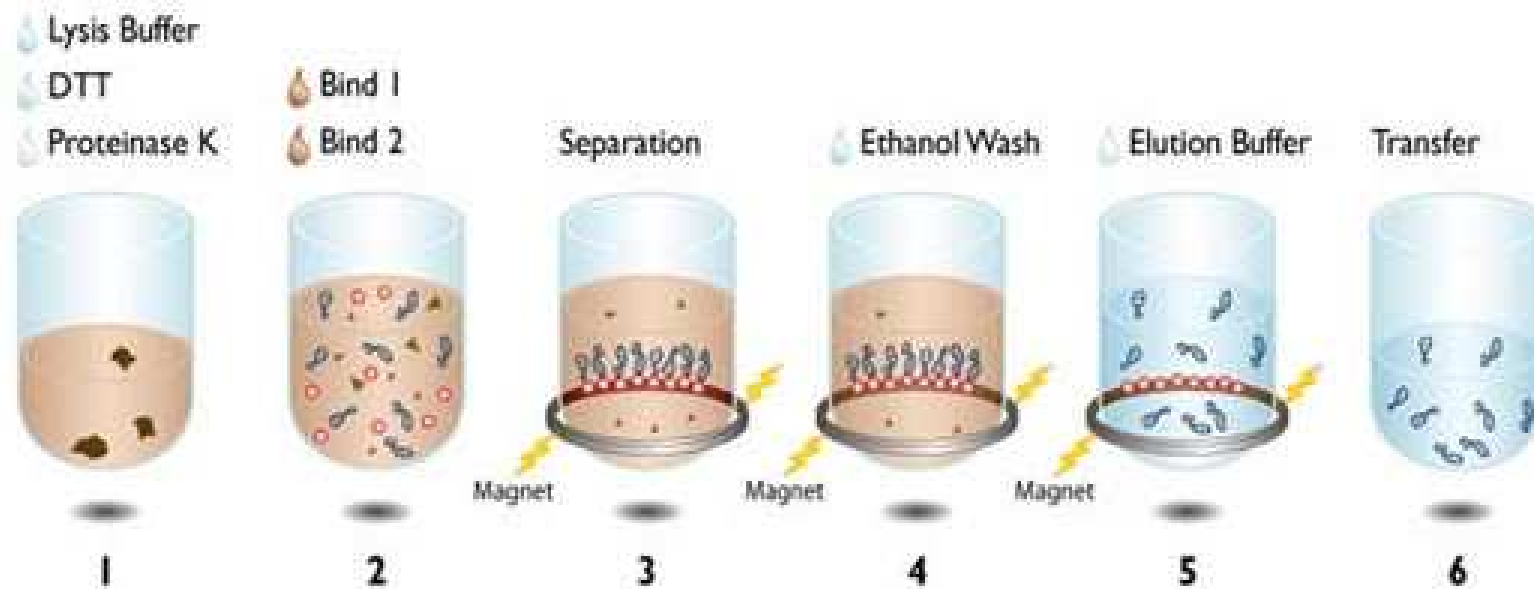
Очистка (депротеинизация)

Колонки (Spin columns)

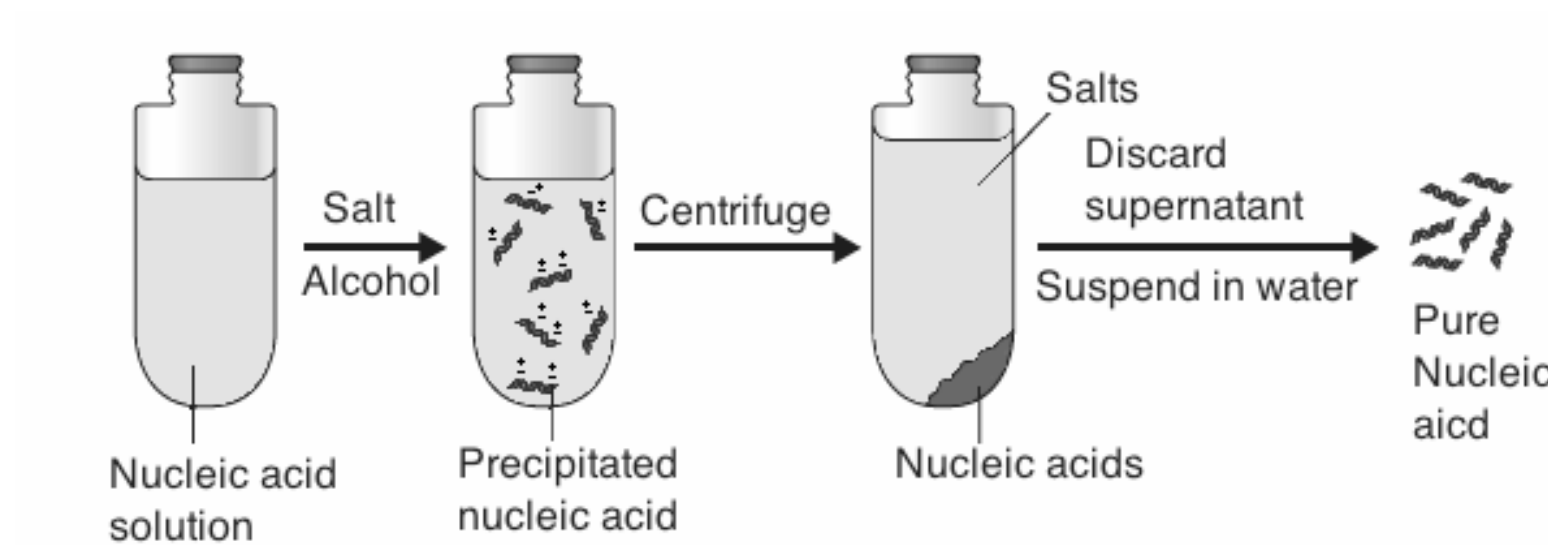


Очистка (депротеинизация)

Магнитные частицы (Magnetic Beads)



Осаждение (преципитация) и растворение ДНК



1. Добавляем 1/10 объёма ацетата аммония (или другой соли).
2. Добавляем 2,5-3 объёма этилового или изопропилового спирта (95%).
3. Инкубация в холоде (-20°C) от 15 мин.
4. Центрифугирование на максимальных оборотах (~ 14000) около 30 мин. (чем больше, тем лучше, но после 20 мин. Эффективность резко снижается).
5. Удаляем супернатант, не потеряв осадок.
6. Промываем осадок 2 раза 70% этанолом.
7. Растворяем осадок в деионизированной воде или буфере для хранения (TE).

Основные производители коммерческих наборов (колонки)

1. Qiagen (Кайаджин). Финляндия. 50 выделений ~ 14000 руб.
2. Синтол. Москва. 100 выделений - 2050 руб.
3. Евроген. Москва. 50 выделений – 3025 руб.



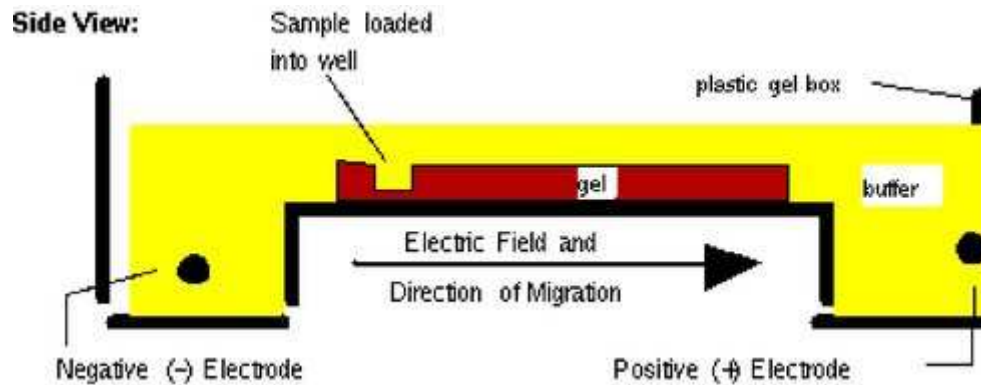
Евроген



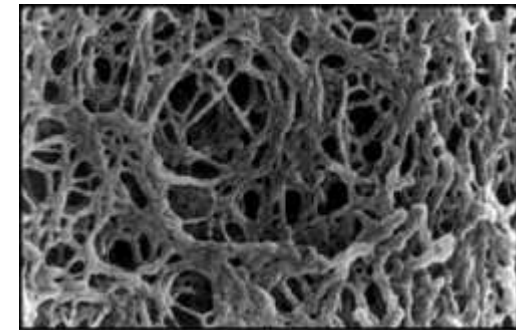
Синтол

Оценка качества и количества ДНК

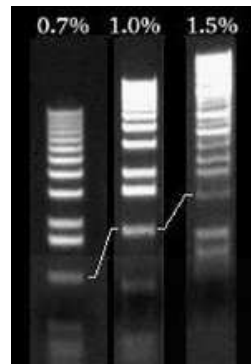
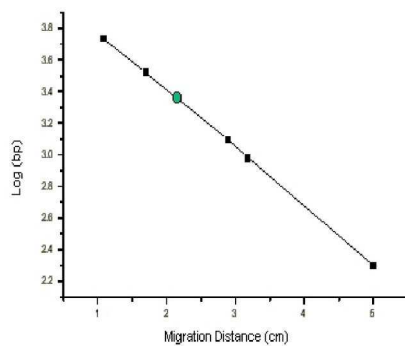
Электрофорез в агарозном геле.



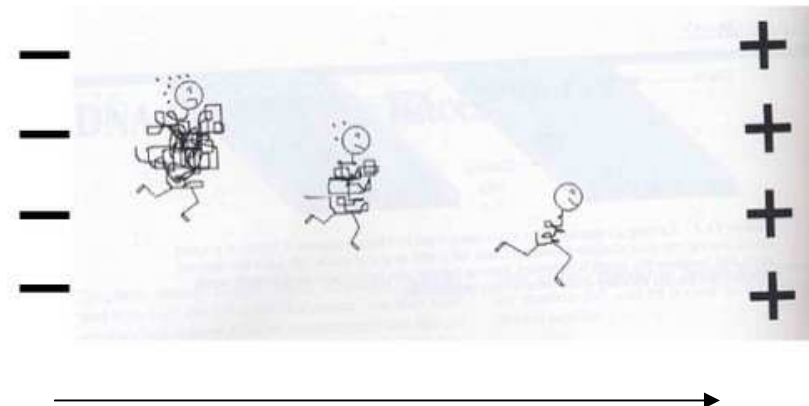
Принципиальная схема гель-электрофореза ДНК



Изображение агарозного геля под сканирующим микроскопом.

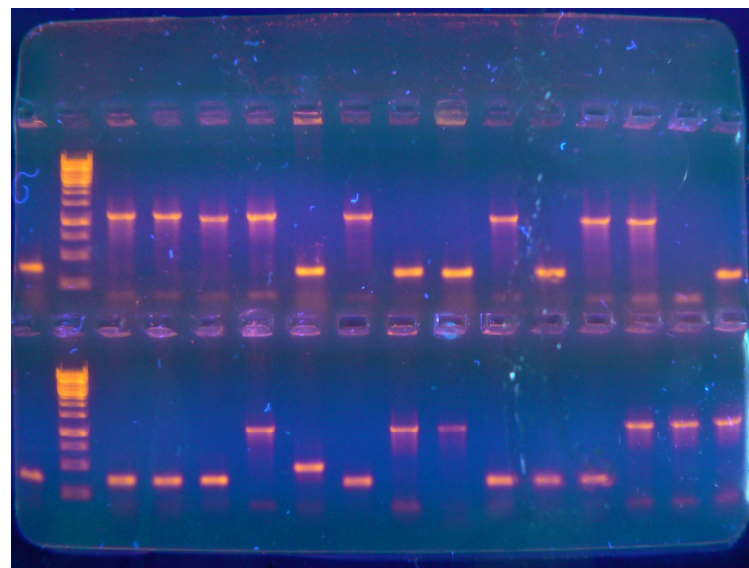
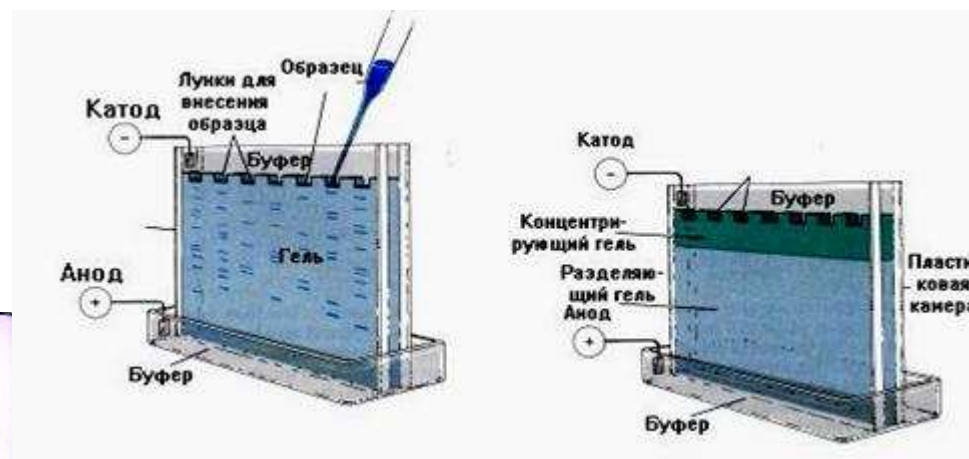
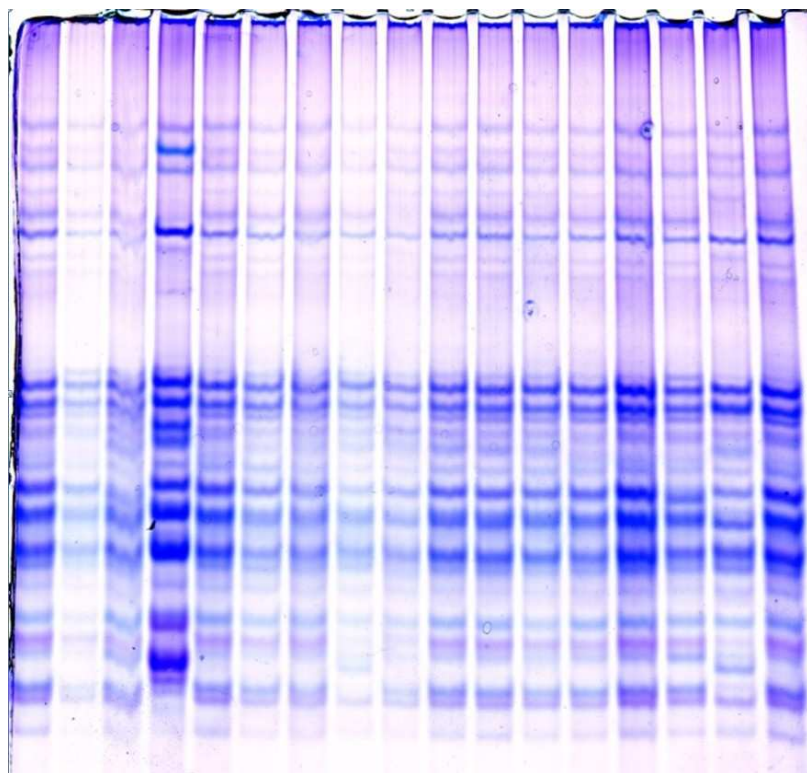


Зависимость скорости миграции от величины фрагмента ДНК и процентного отношения агарозы в геле



1809 г. – описано явление **электрофорез**. Профессора МГУ П.И. Страхов и Ф.Ф. Рейсс.

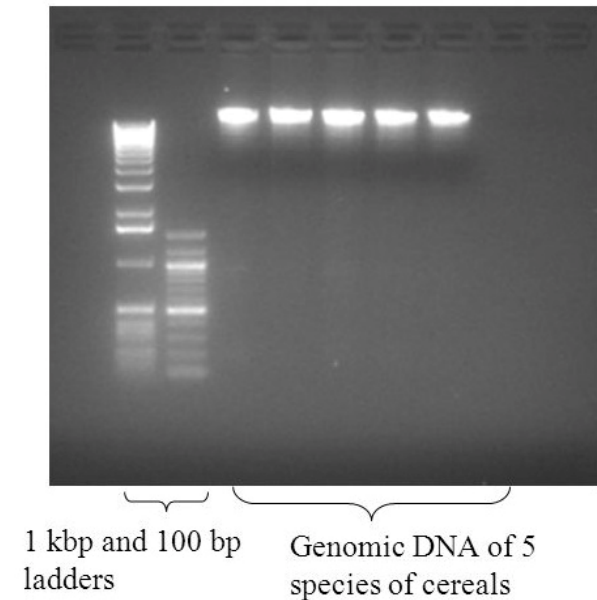
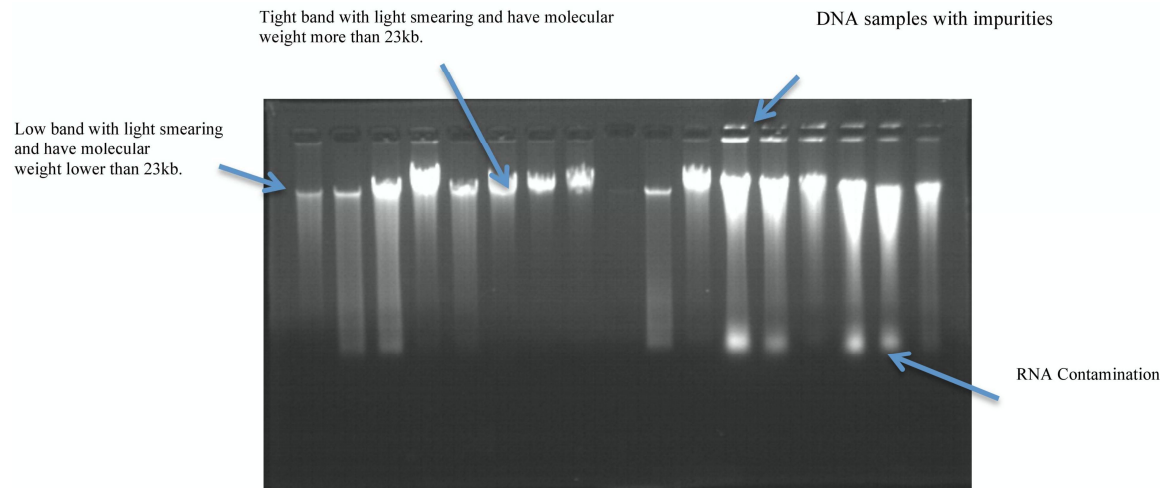
Электрокинетическое явление перемещения частиц дисперсной фазы (коллоидной или белковой фазы) в жидкой или газообразной среде под действием внешнего электрического поля.



Оценка качества и количества ДНК

Электрофорез в агарозном геле. Дёшево. Неточно.

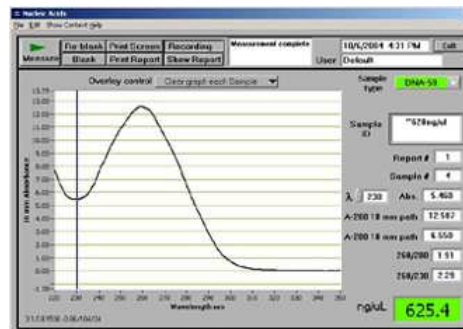
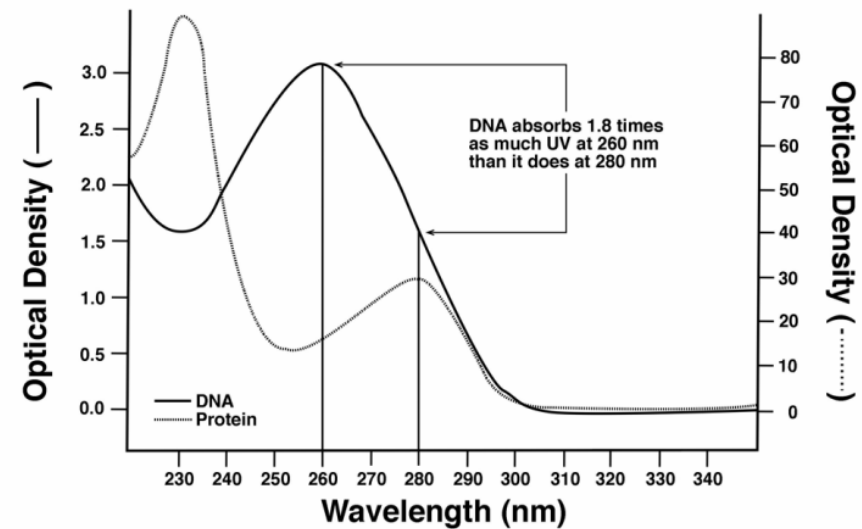
Визуализация под ультрафиолетовым светом после включения (интеркаляции) бромистого этидия в основания ДНК. Светится **оранжевым**. **Интенсивность свечения** после встраивания в основания ДНК увеличивается в **20 раз**.



Оценка качества и количества ДНК

Спектрофотометр. NanoDrop. Дорого, но не требует специфических расходников. Метод зависим от чистоты ДНК.

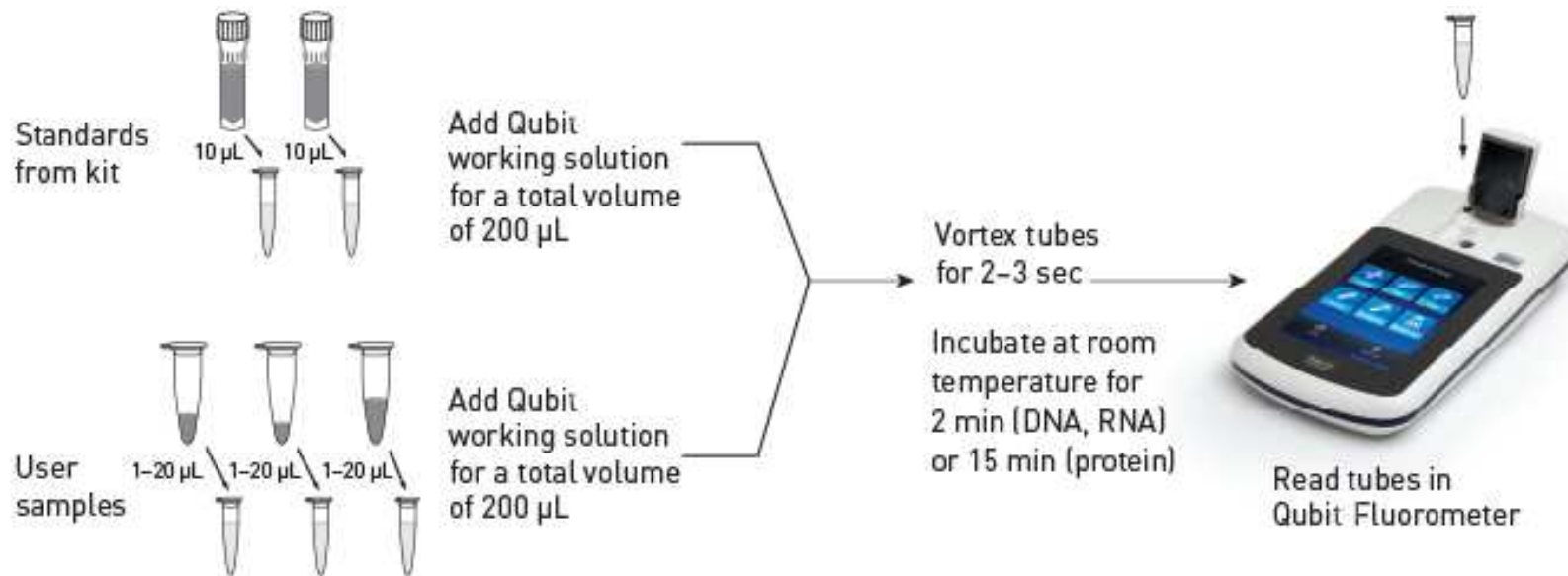
Абсорбция ДНКой ультрафиолетового света.



Оценка качества и количества ДНК

Флуориметр. Qbit. Дорого. Необходимы специфические реактивы. Очень точно. Универсально.

Детекция свечения красителя, связанного с основаниями ДНК.



Литература

1. **bitesizebio.com**

2. **molbiol.ru**

3. Truett, G.E., R.L. Mynatt, A.A. Truett, J.A. Walker, and M.L. Warman. 2000. Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and Tris (HotSHOT). *BioTechniques* 29:52-54.

4. Meeker, N. D., Hutchinson, S. A., Ho, L., & Trede, N. S. (2007). Method for isolation of PCR-ready genomic DNA from zebrafish tissues. *BioTechniques*, 43(5), 610.

5. Sambrook J., Russell D.W. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. 2001.

6. **Заславская Н.И.**, Скурихина Л.А. Анализ полиморфизма ДНК и белков высших организмов: Учебно-методическое пособие к большому практикуму по генетике. – Владивосток: Изд-во Дальневост. ун-та, 2007, – 88 с.

7. Boom R., Sol C. J., Salimans M.M., Jansen C.L., Wertheim-van Dillen P.M., van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids // *J. Clin. Microbiol.* 1990. Vol. 28. no. 3. P. 495–503.

8. Montero-Pau, J., Gómez, A. & Muñoz, J. (2008) Application of an inexpensive and high-throughput genomic DNA extraction method for the molecular ecology of zooplanktonic diapausing eggs. *Limnology and Oceanography: Methods* 6: 218-222.

9. McMurry J. Organic chemistry. 6th edition. Brooks Cole. 2003.

10. Zeugin J.A., Hartley J.L. Ethanol Precipitation of DNA // *Focus*. 1985. Vol. 7. no. 4. P. 1–2.

11. Crouse J., Amorese D. Ethanol Precipitation: Ammonium Acetate as an Alternative to Sodium Acetate // *Focus*. 1987. Vol. 9. no. 2. P. 3–5.