

Сбор биологического материала для генетических исследований и выделение нуклеиновых кислот

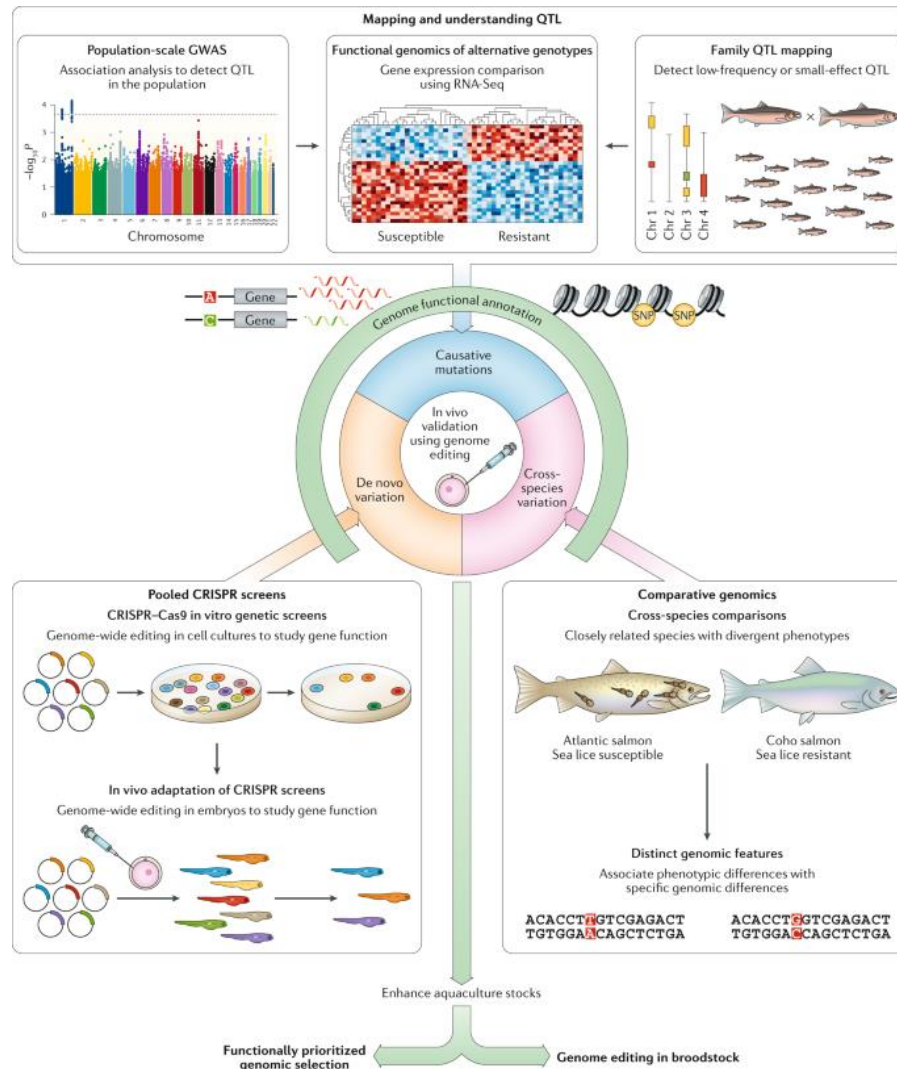
Туранов С.В.

ИНЦМБ ДВО РАН

Лаб. Молекулярной систематики

Осень 2021

Наиболее распространённые стратегии обнаружения функциональных вариантов с помощью геномики и редактирования генома



Houston, R.D., Bean, T.P., Macqueen, D.J. et al. Harnessing genomics to fast-track genetic improvement in aquaculture. Nat Rev Genet 21, 389–409 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41576-020-0227-y>

1. Сбор и хранение биологического материала (организменной и средовой ДНК/РНК) для генетических исследований.

2. Методы выделения и очистки нуклеиновых кислот.

Сбор и хранение организменной ДНК

Источники:

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

Важно избежать:

1. Деградации ДНК (фиксация в этиловом спирте с последующей заменой фиксатора на новый).
2. Перекрёстной контаминации (одноразовые либо стерилизуемые инструменты).

Запомнить:

ДНК



Сбор и хранение организменной РНК

Основные источники:

Ткань костных мышц, сердце, икра, печень, мозг (в зависимости от задачи, т.к. в разных типах ткани активны разные участки генома).

Важно избежать:

1. Дегградации РНК (немедленно приступить к выделению, либо поместить в жидкий азот; как альтернатива - непродолжительная [до месяца] фиксация в RNA later или его аналоге).
2. Перекрёстной контаминации (одноразовые либо стерилизуемые инструменты).

Запомнить:

РНК очень нестабильна, быстро и охотно деградирует.



Процесс сбора и фиксации ДНК из водной среды



Отечественная
разработка.
Модифицированный
пистолет для герметика
😊



Набор (комплект) для сбора
и фиксации ДНК из водной
среды.
Аналог набора от Nature
Metrics.

Перчатки

Фильтрующая шприцевая насадка,
заглушки combi-stopper, пробирка с
буфером Лонгмайера

Этикетка

Шприц малого объёма (до 3 мл)

Шприц Жане (160 мл)

Важно: избавиться от остатков спирта перед началом выделения организменной ДНК!

Выделение организменной ДНК:

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

Методы выделения организменной ДНК:

1. Высокотемпературный щелочной лизис.
2. Лизис в присутствии протеиназы К.

Методы очистки ДНК:

1. Хлороформ-фенольный.
2. Колонки (коммерческие наборы).
3. Магнитные частицы (коммерческие наборы).
4. И... многие другие

Методы осаждения ДНК:

1. Соль + спирт (ДНК связывается с положительными ионами охотнее при добавлении спирта – раствор делается менее полярным) + центрифугирование (формирование осадка).

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.

Высокотемпературный 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 в присутствии 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

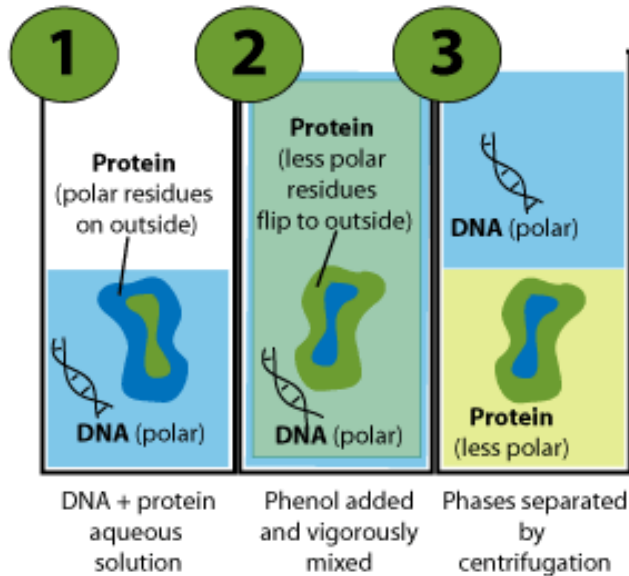
Минусы: время

Очистка (депротеинизация)

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

Очистка (депротеинизация)

Хлороформ-фенольный метод (с модификациями)



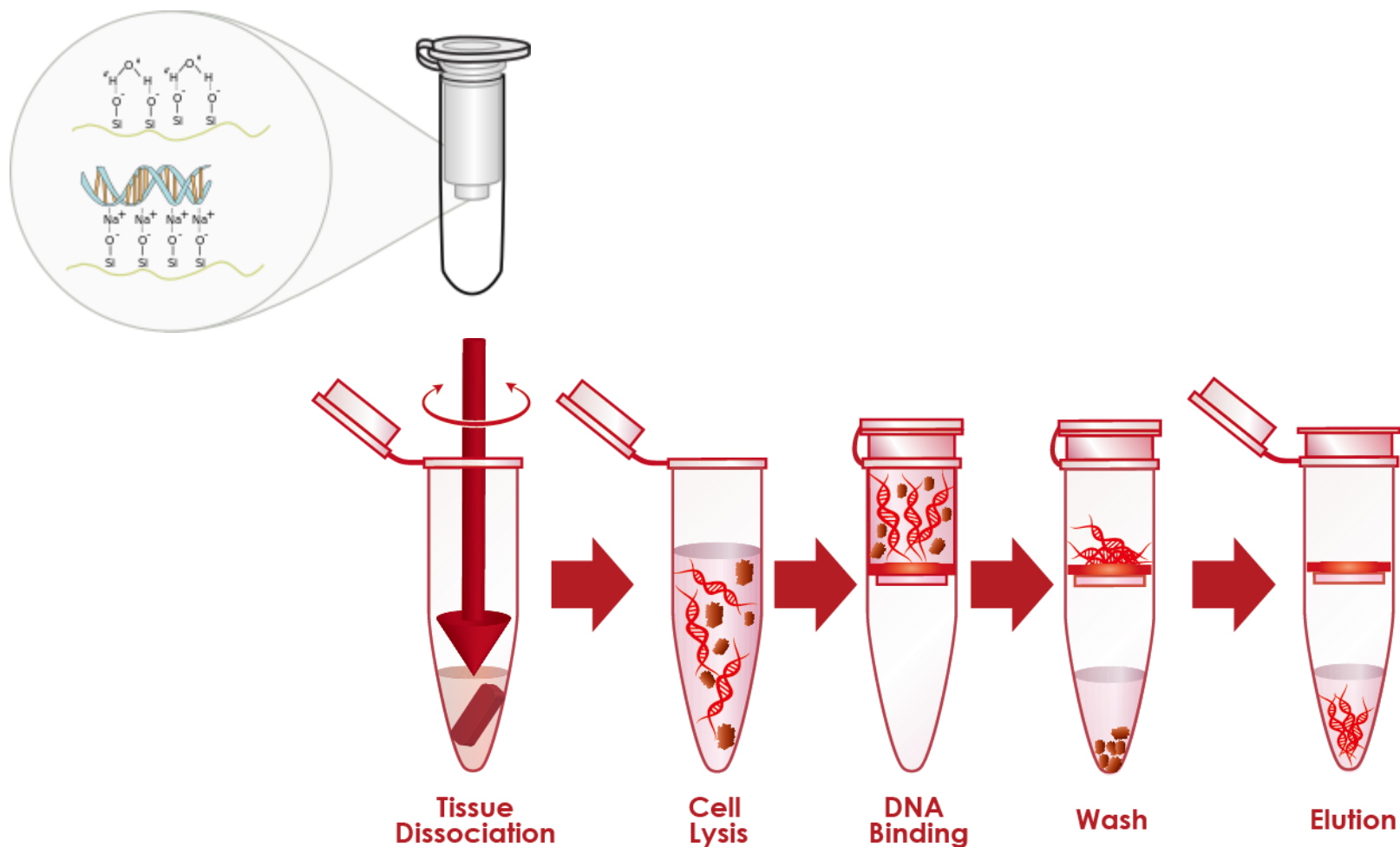
<http://bitesizebio.com/384/the-basics-how-phenol-extraction-works/>

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



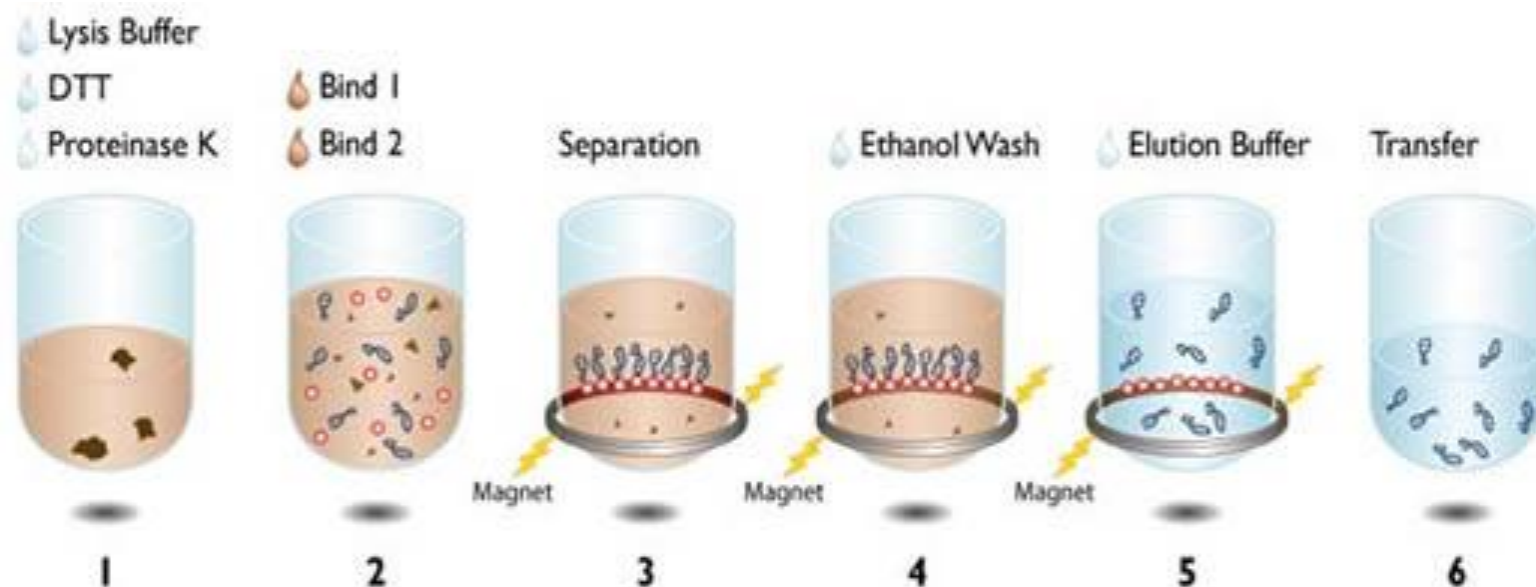
Очистка (депротеинизация)

Колонки (silica spin columns)

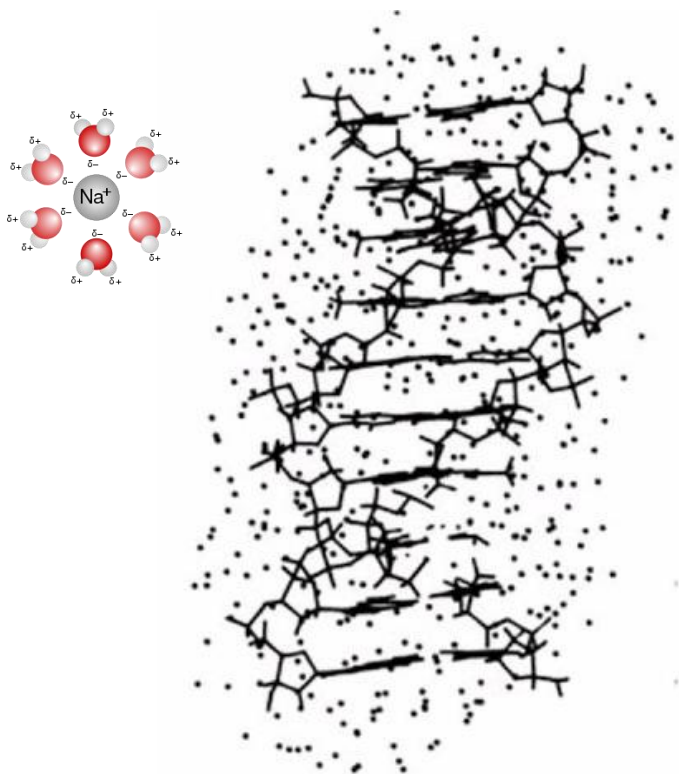


Очистка (депротеинизация)

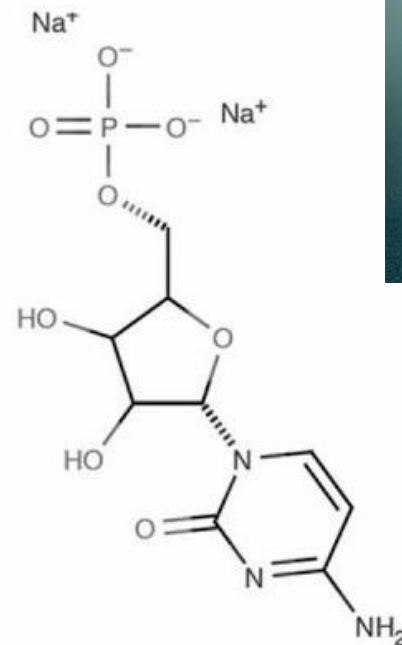
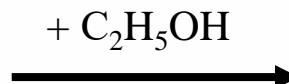
Магнитные частицы (Magnetic Beads)



Осаждение (преципитация) и растворение ДНК

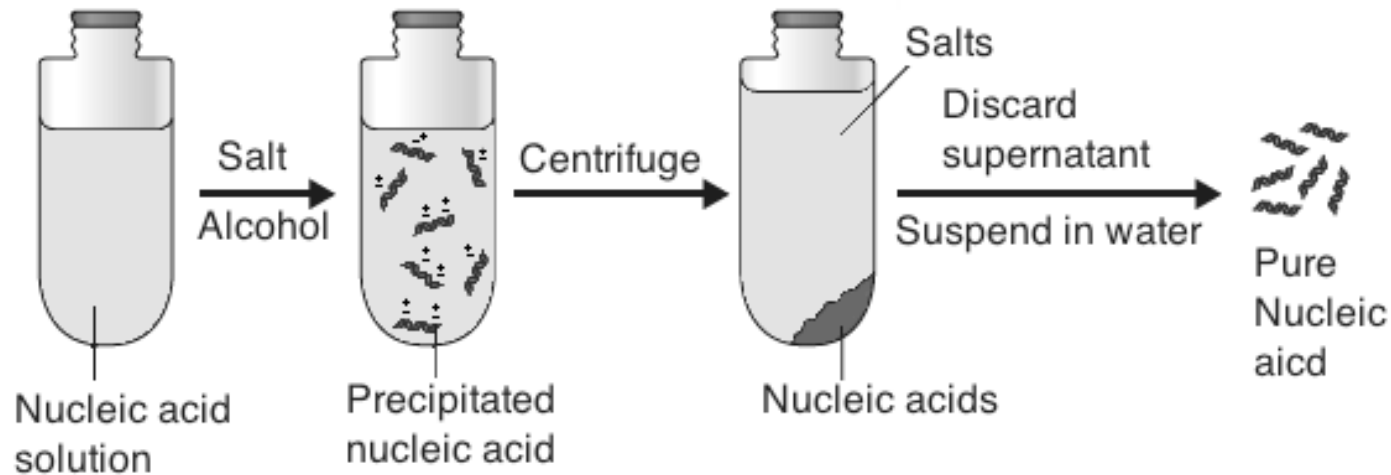


Полярная ДНК, окруженная полярными же молекулами воды в растворе (справа). Катионы натрия, окруженные молекулами воды (слева).



Катионы натрия, нейтрализующие ДНК при добавлении в раствор спирта, делающего раствор менее полярным.

Осаждение (преципитация) и растворение ДНК



1. Добавляем 1/10 объёма ацетата аммония (или другой соли).
2. Добавляем 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).
2. Синтол. Москва.
3. Евроген. Москва.



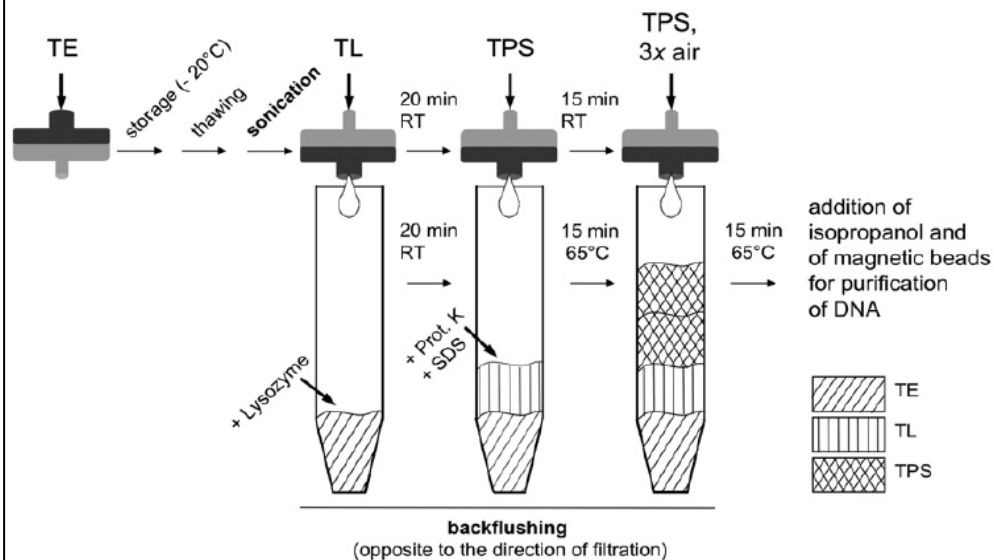
Евроген



Синтол

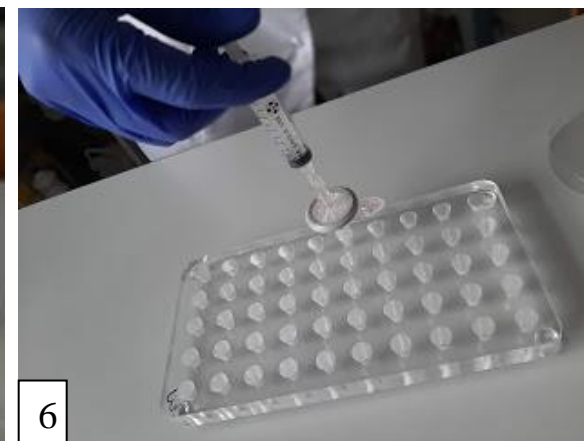
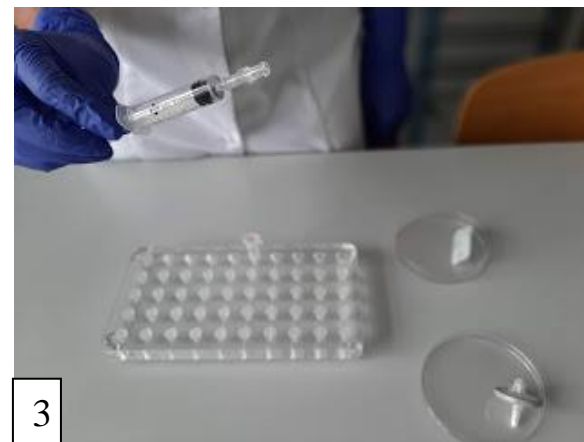
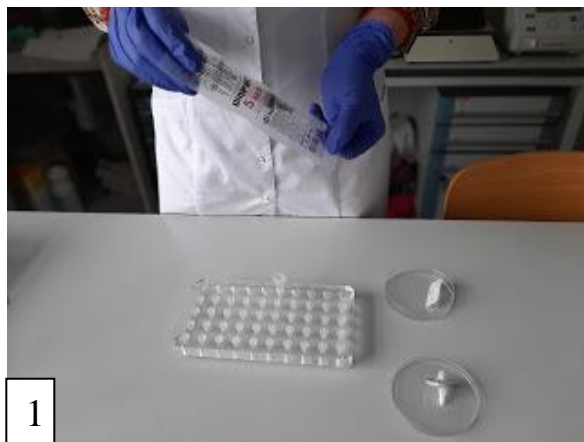
Выделение средовой ДНК (ДНК из водной среды) из фильтрующих насадок

A.I. Kesberg, D. Schleheck / *Journal of Microbiological Methods* 93 (2013) 55–57



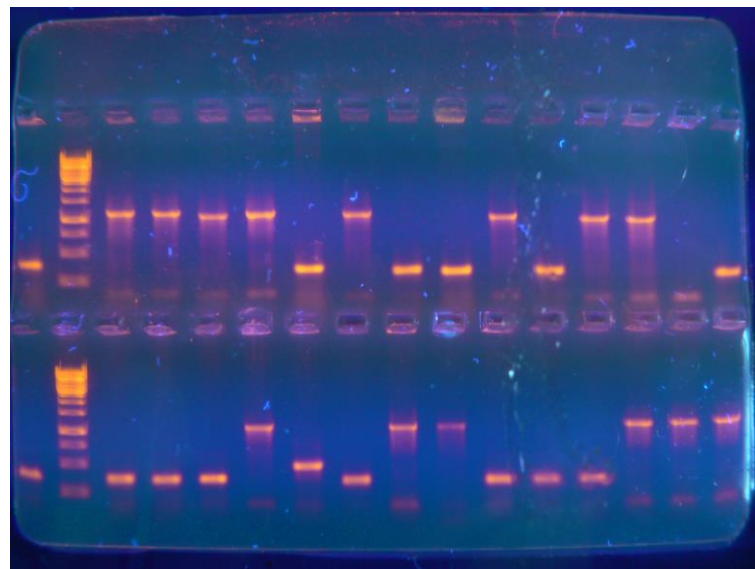
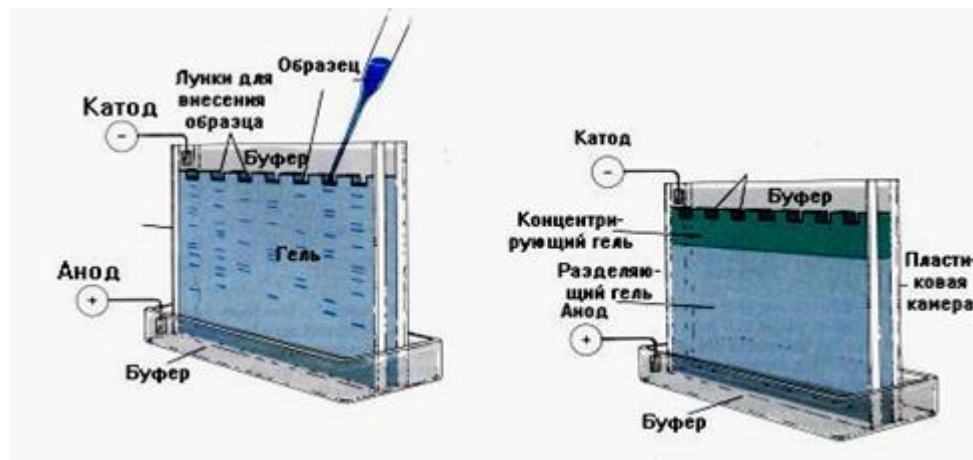
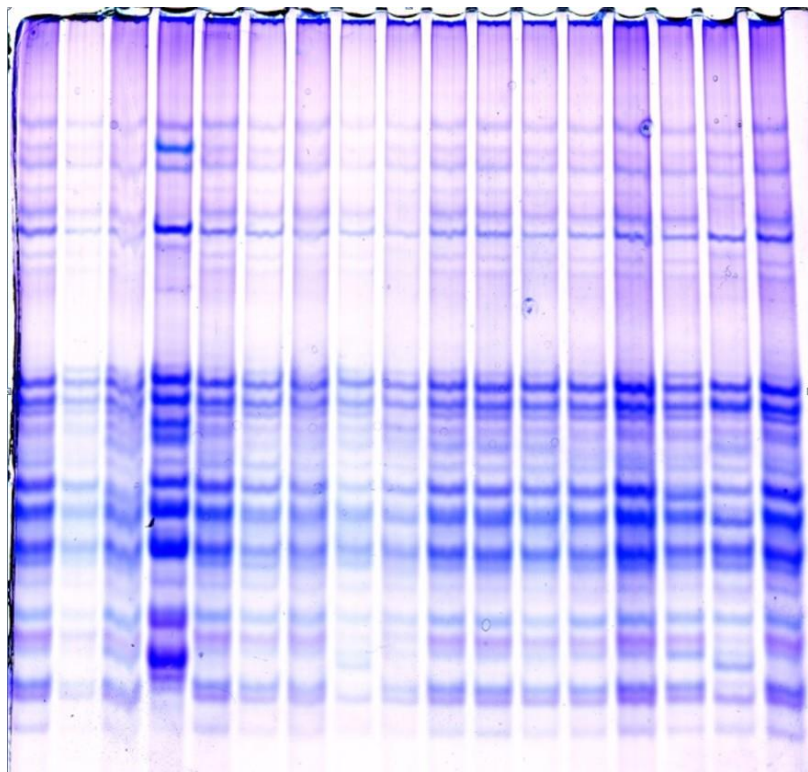
М-Сорб-ООМ. Набор для выделения ДНК из образцов окружающей среды, на основе магнитных частиц. Компания Синтол.

Процесс выделения средовой ДНК методом обратной промывки шприцевой насадки



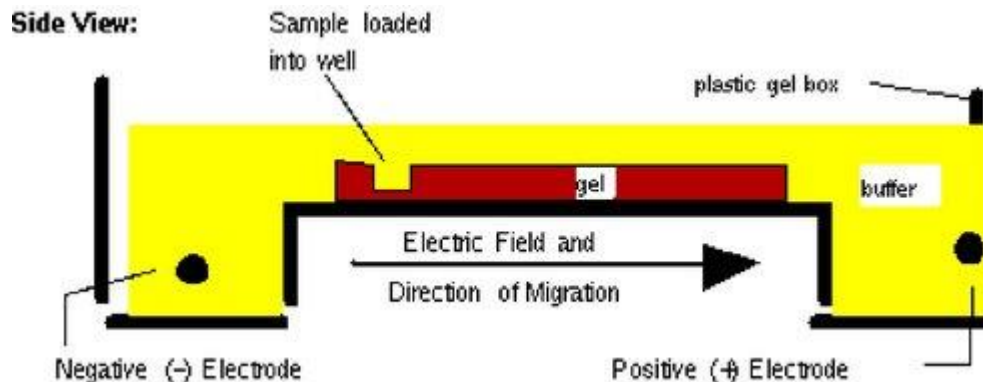
1809 г. – описано явление **электрофорез**. Профессора МГУ П.И. Страхов и Ф.Ф. Рейсс.

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

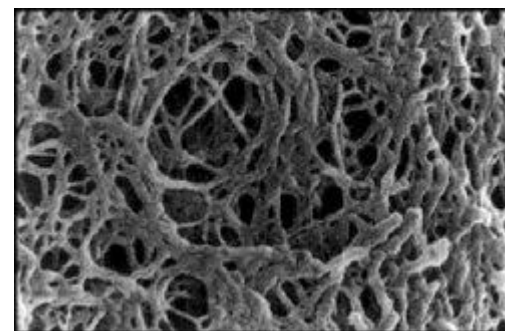


Оценка качества и количества выделенной ДНК

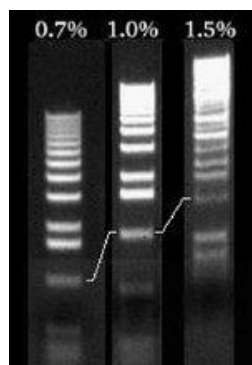
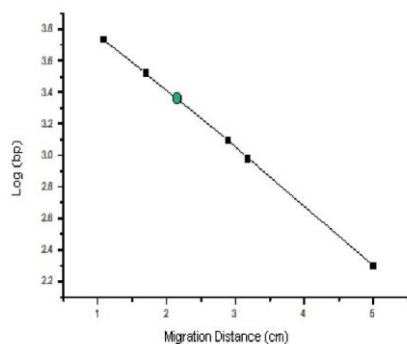
Электрофорез в агарозном геле.



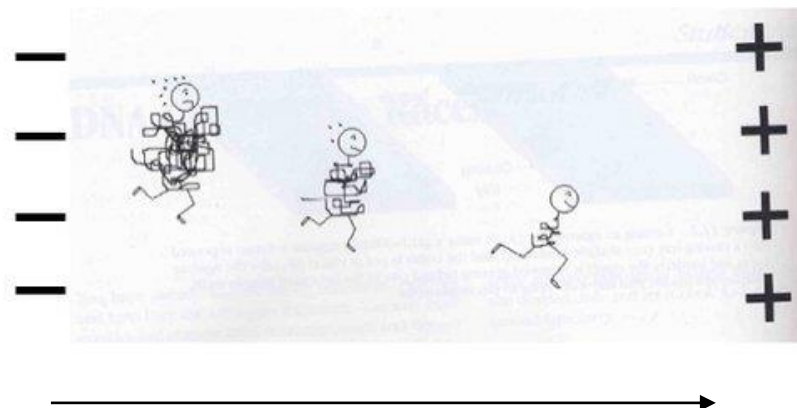
Принципиальная схема гель-электрофореза ДНК



Изображение агарозного геля под сканирующим микроскопом.



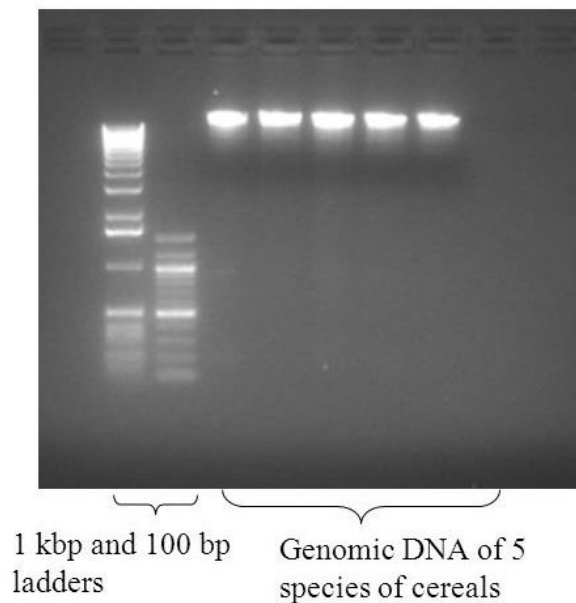
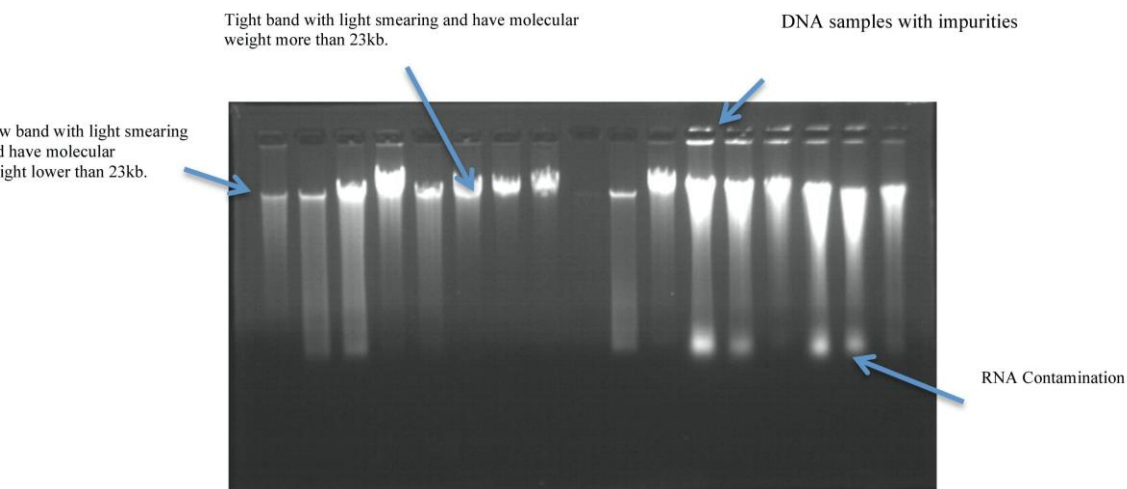
Зависимость скорости миграции от величины фрагмента ДНК и процентного отношения агарозы в геле



Оценка качества и количества выделенной ДНК

Электрофорез в агарозном геле. Дёшево. Неточно.

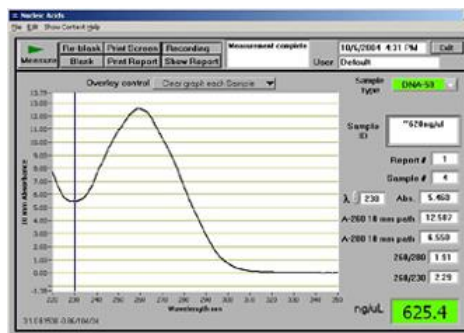
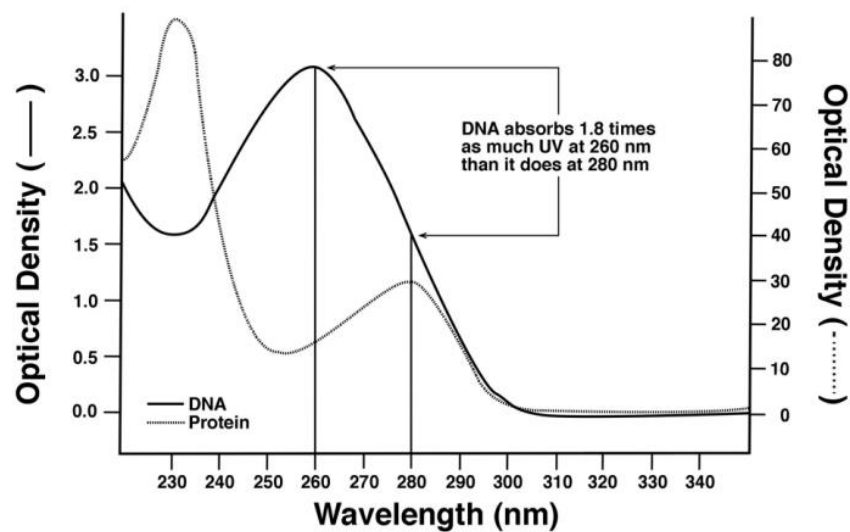
Визуализация под ультрафиолетовым светом после включения (интеркаляции) бромистого этидия в основания ДНК. Светится **оранжевым**. **Интенсивность свечения** после встраивания в основания ДНК увеличивается в **20 раз**.



Оценка качества и количества выделенной ДНК

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

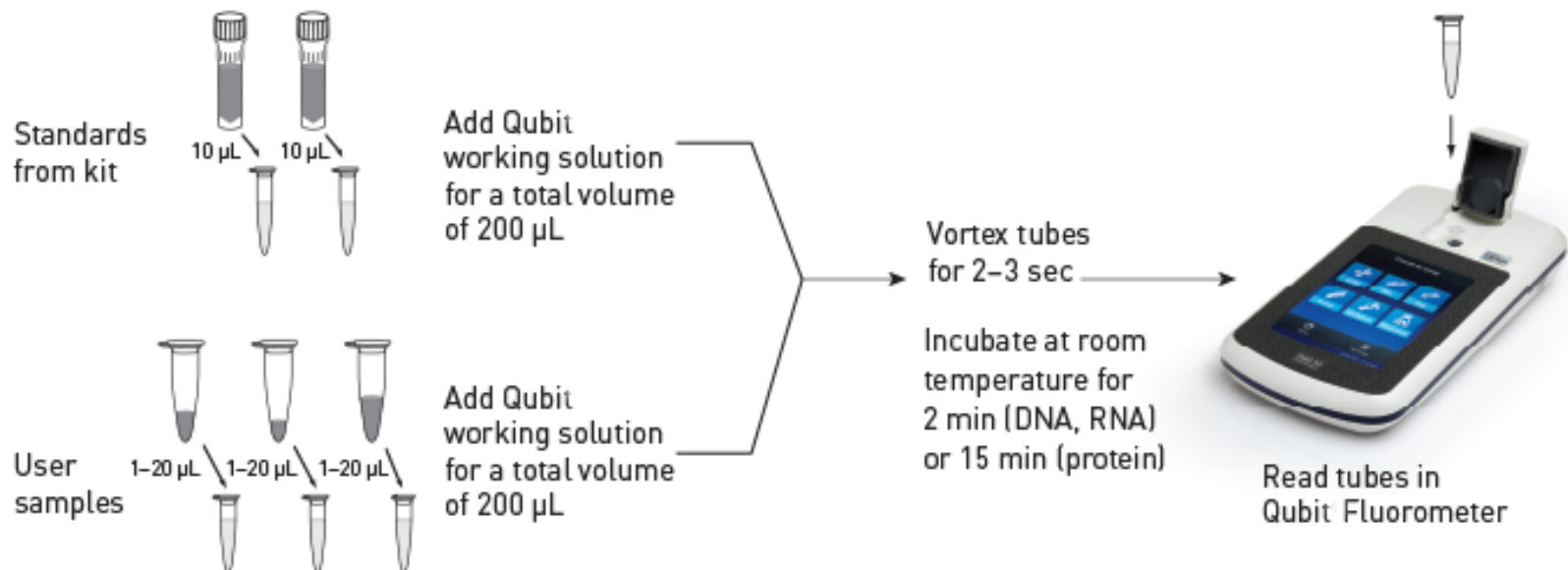
Абсорбция ДНКой ультрафиолетового света.



Оценка качества и количества выделенной 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.