**Основные вопросы, выносимые на обсуждение семинара.**

1. Методы экстракции на основе органических растворителей,
2. Методы экстракции с помощью силики,
3. Методы экстракции на основе гель-фильтрации,
4. Методы экстракции на основе магнитных частиц,
5. Методы экстракции на основе ионообменных смол,
6. Методы экстракции на микроцентрифужных колонках,
7. Методы экстракции на бумажных фильтрах.

**Краткое содержание темы:**

Выделение ДНК и РНК — важный шаг подготовки проб перед биохимическими и диагностическими процессами. Многие приложения, такие как амплификация, проведение обратной транскрипции, детектирование накопления продуктов амплификации методом ПЦР в реальном времени, клонирование, секвенс, гибридизация, синтез ДНК и т. д., не могут быть выполнены непосредственно на биологических образцах без предварительной очистки нуклеиновых кислот.

При выборе метода необходимо учитывать приоритет предъявляемых к нему требований, таких как высокий выход нужной нуклеиновой кислоты, быстрота метода, большая пропускная способность или высокое качество продукта. Присутствие загрязняющих веществ, например белков или карбогидратов, в таких комплексных смесях часто мешает реализовать необходимые реакции и методики. Методы выделения нуклеиновых кислот можно разделить по основным физическим и биохимическим признакам на следующие классы:

– жидкофазные методы;

– твердофазные методы.

Классические методы выделения нуклеиновых кислот из сложных исходных образцов, таких как кровь или ткани, включают в себя лизис биологического материала детергентами или хаотропными агентами иногда в присутствии разрушающих белки ферментов. После этого этапа следуют несколько стадий, в которых используются органические растворители, такие как фенол и/или хлороформ или этанол. Полное отделение белков от нуклеиновых кислот может быть достигнуто добавлением перхлората натрия. Для отделения РНК от ДНК необходимо селективное инкубирование с хлоридом лития или специфичное безнук леазное изолирование с гуанидин хлоридом или гуанидин тиоцианатом, скомбинированное с фенольной экстракцией или этанольной преципитацией. Такие методы увеличивают вероятность деградации нуклеиновых кислот, потери образца или кросс-контаминации образцов, если несколько проб обрабатываются одновременно. При выделении РНК очень велик риск контаминации со стороны присутствующей в исходном образце ДНК.

Стандартная методика получения чистого препарата основана на том, что ДНК является полярной молекулой и не растворяется в органических растворителях. Традиционно для выделения ДНК используется фенол-хлороформная экстракция. При перемешивании клеточного лизата и фенола формируются две фазы. ДНК находится в верхней (водной) фазе, а денатурированные белки — в нижней (органической) фазе. Однако этот метод ориентирован на работу с такими агрессивными веществами, как фенол и хлороформ, и присутствуют стадии центрифугирования и жидкостной экстракции, которые нельзя автоматизировать.

В твердофазных методах выделения нуклеиновых кислот используются следующие процессы и принципы:

* водородные связи с немодифицированной гидрофильной матрицей, обычно кварцем, в хаотропных условиях;
* ионообмен в водном растворе, обычно с использованием анионообменников;
* аффинность;
* механизмы исключения по размеру.

Твердофазные системы, адсорбирующие нуклеиновые кислоты, — это частицы на основе кварца, стеклянные волокна, анионообменные носители, которые используются в хроматографических сепарационных колонках. Эти носители применяются для выделения или очистки нуклеиновых кислот с высококонцентрированными растворами хаотропных солей (йодид натрия, перхлорат натрия, гуанидин тиоцианата). Описано применение диатомовой земли в качестве сорбента, в этом случае связывание также происходит в присутствии хаотропной соли. Другие методы основаны на совместной детергенции с материалами, связывающими нуклеиновые кислоты, или на использовании твердого сорбента со связывающими нуклеиновые кислоты функциональными группами в сочетании с полиэтиленгликанами и солями в высокой концентрации. Известна группа методов пробоподготовки, основанная на использовании ионообменников типа Chelex, cорбирующих примеси, мешающие ПЦР. Однако эти методы в большинстве случаев не могут удалить все возможные примеси, поэтому их применение довольно ограничено.

Использование магнитных твердых носителей в биохимических и молекулярно биологических процессах имеет много преимуществ по сравнению с немагнитными сепарационными методами. Обычно магнит прикладывается к стенке сосуда, содержащего образец, чтобы частицы агрегировали у стенки сосуда, а остаток образца можно было убрать. Таким способом можно отделять компоненты клеточного лизата, которые ингибируют ДНК-полимеразу и ПЦР-реакцию, например полисахариды, фенольные компоненты, гумус. Для процесса выделения используются магнитные носители с иммобилизированными аффинными лигандами или изготовленные из биополимера, увеличивающего аффинность к нужной нуклеиновой кислоте. Магнитные частицы производятся из различных синтетических полимеров, биополимеров, пористого стекла или на основе неорганических магнитных материалов, таких как оксид железа с модифицированной поверхностью. Особенно подходят для выделения суперпарамагнитные частицы, которые не взаимодействуют друг с другом в отсутствие магнитного поля. Эти частицы приобретают магнитный момент в сильном магнитном поле, но не сохраняют постоянного магнетизма, когда поле убирают. Если устранены магнитная агрегация и слипание частиц, то в течение реакции достигается суспензирование частиц и единообразная экстракция нуклеиновых кислот.