



**ВОЛГОГРАДСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ**

Основные методы выделения нуклеиновых кислот

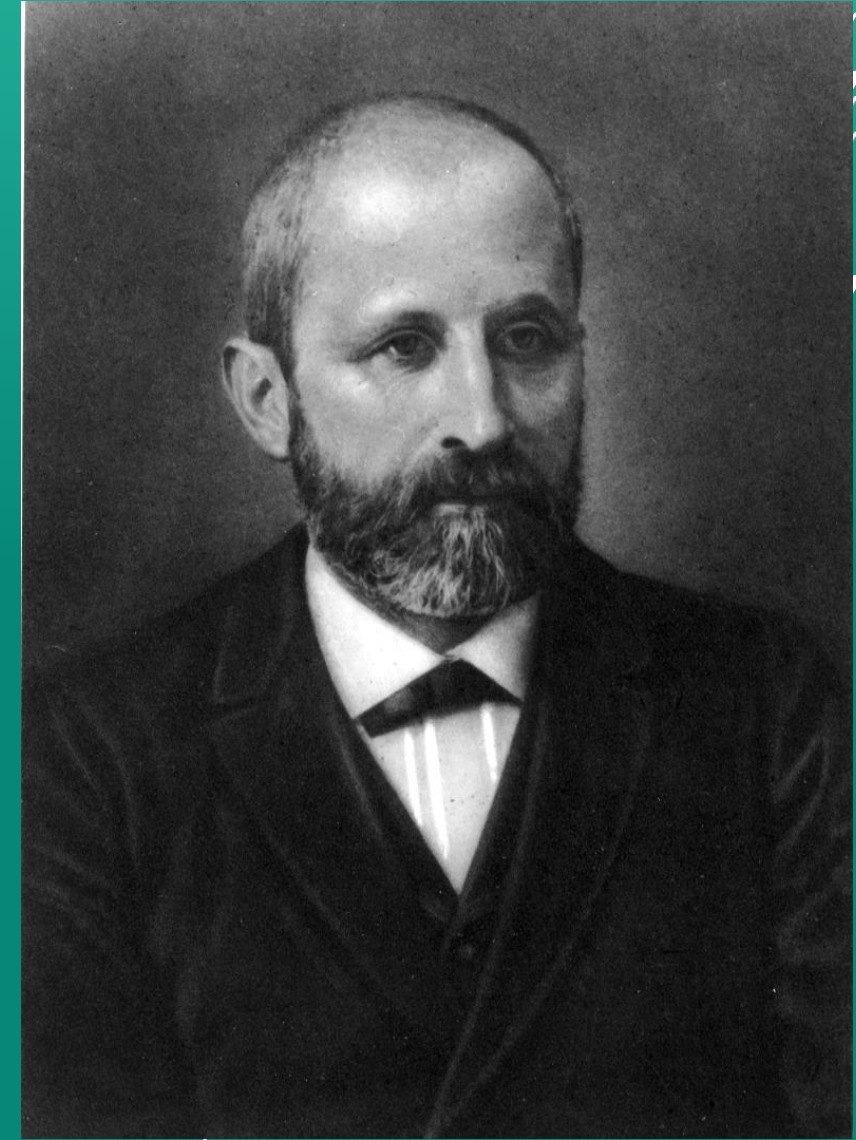
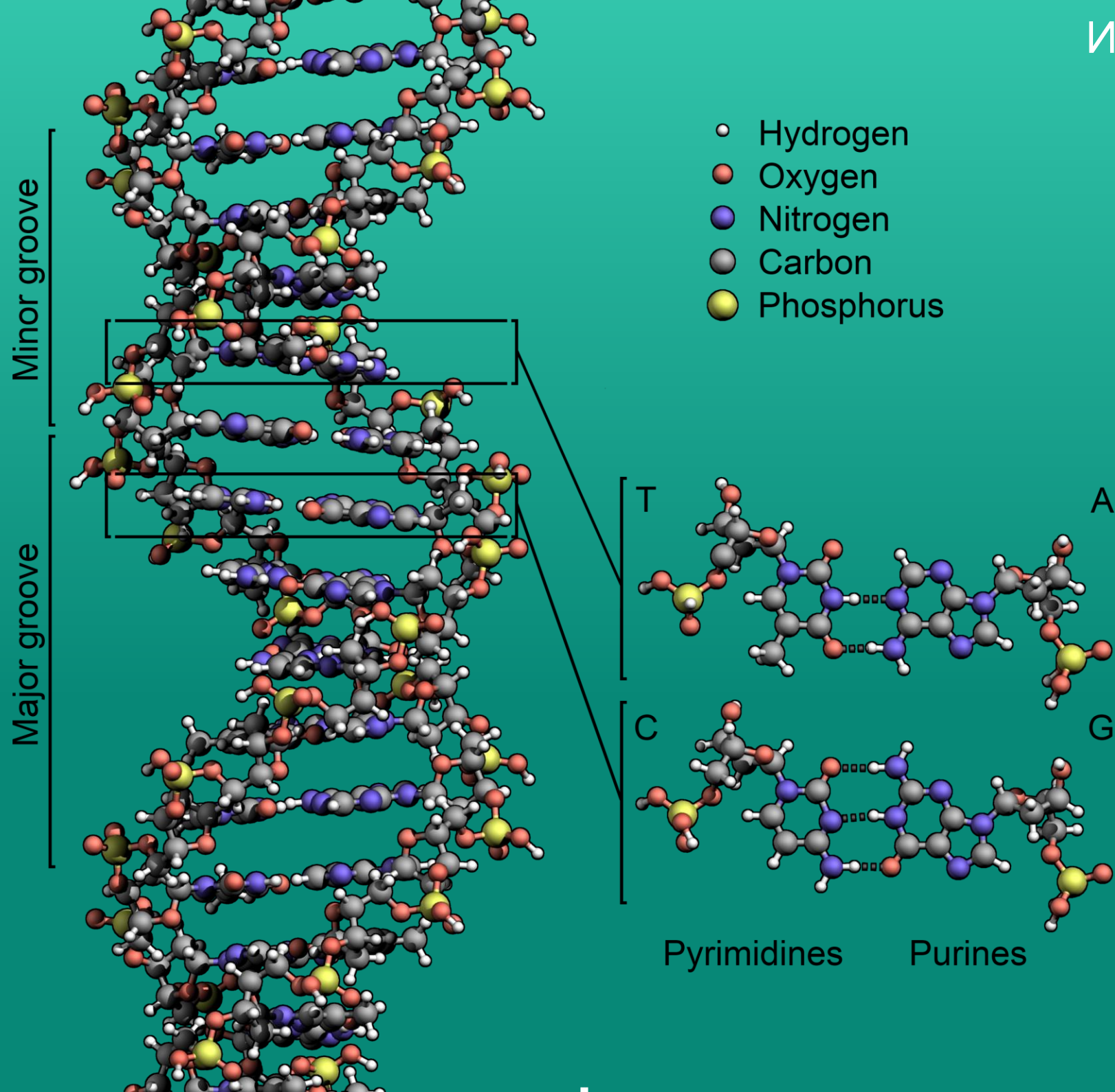
ЭУК СРО по дисциплине
«Спецпрактикум»

Семестр 6_раздел 1

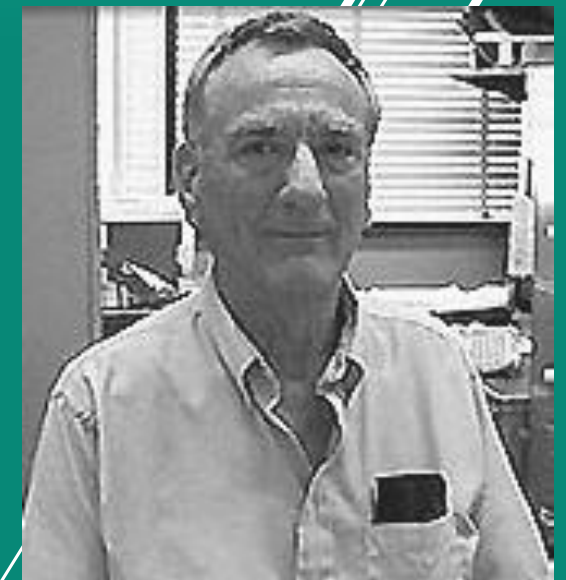
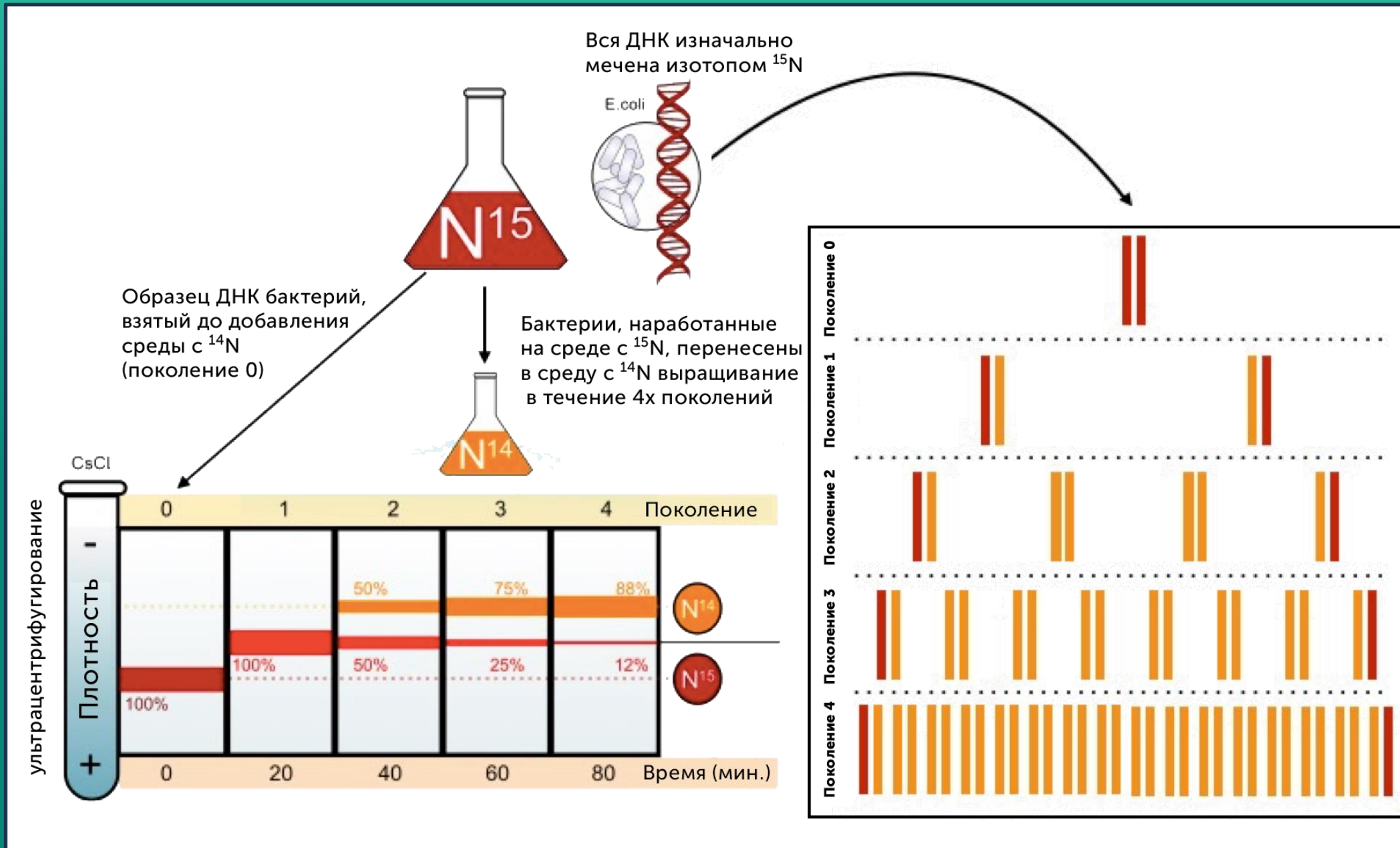
Подготовил: ассистент кафедры
фундаментальной медицины и
биологии

Доценко Анна Михайловна

Изоляция ДНК- 1869г Фридрих Мишер



В 1958 году Метью Мезелсон и Франклин Сталь разработали рутинную лабораторную процедуру выделения ДНК



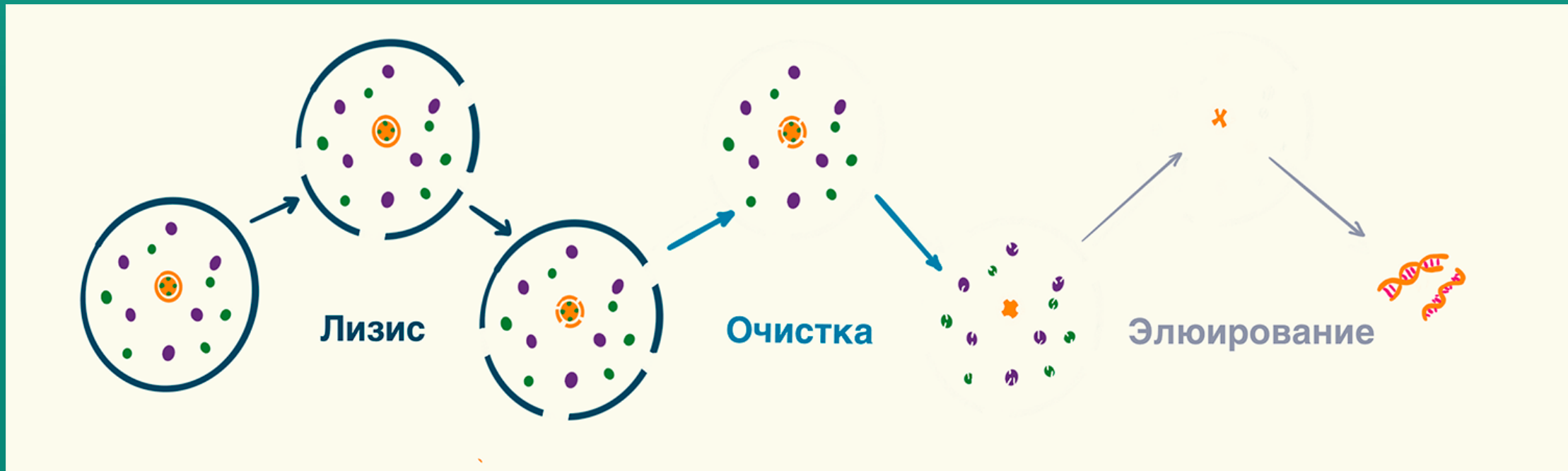
Источники геномной ДНК

В качестве образцов тканей чаще всего используют биоптаты, парафиновые блоки фиксированных формалином тканей — FFPE (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded) и образцы свежесзамороженной ткани. В качестве образцов крови используют цельную кровь с этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА), сухие пятна крови (Dried Blood Spots, DBS)

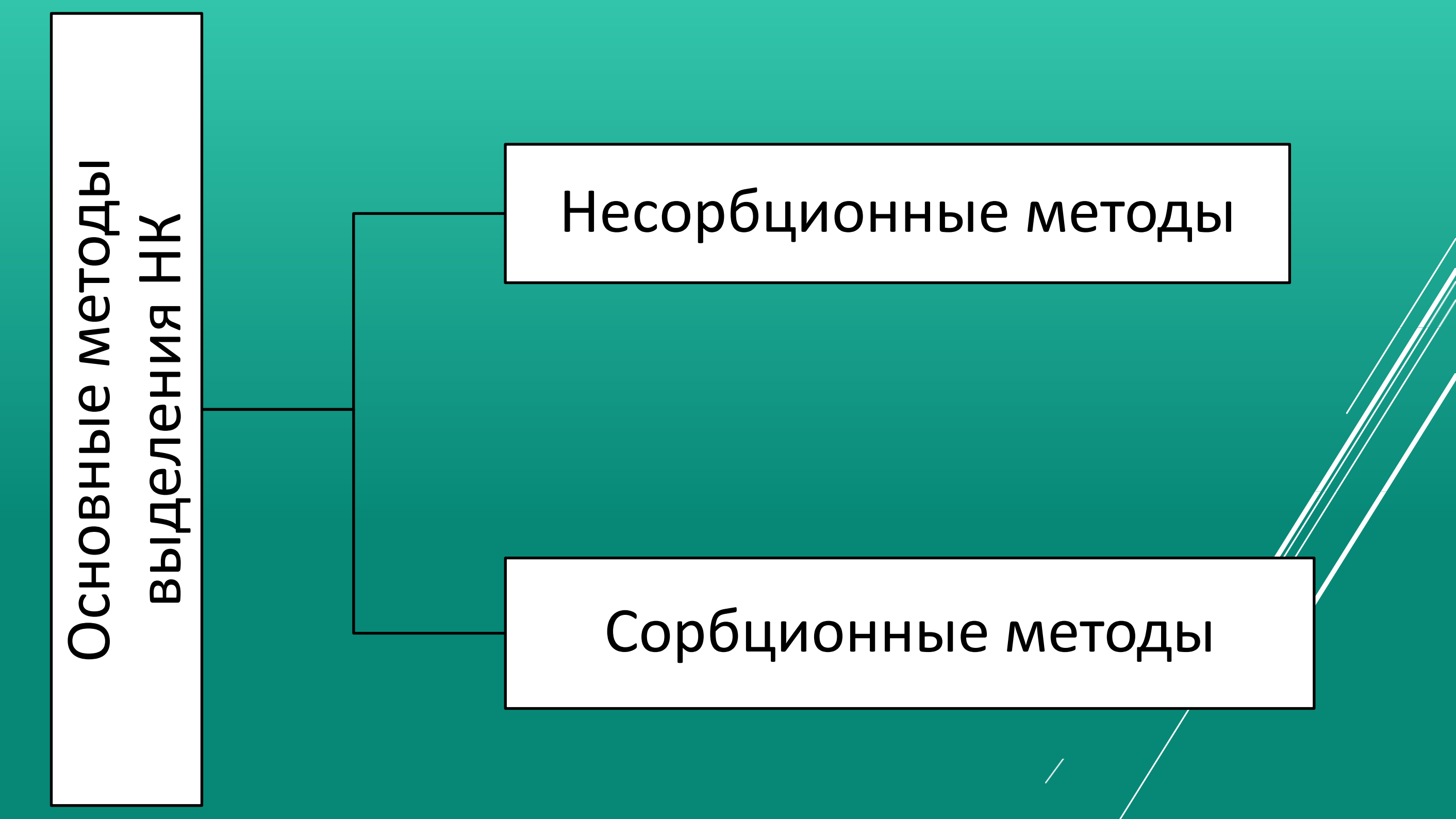


Методы выделения ДНК обычно включают следующие этапы:

- лизис клеток;
- осаждение белков;
- центрифугирование для удаления денатурированных белков и фрагментов клеточных органелл;
- осаждение ДНК из раствора этанолом и после центрифугирования растворение осадка в буферном растворе.



Основные методы выделения НК



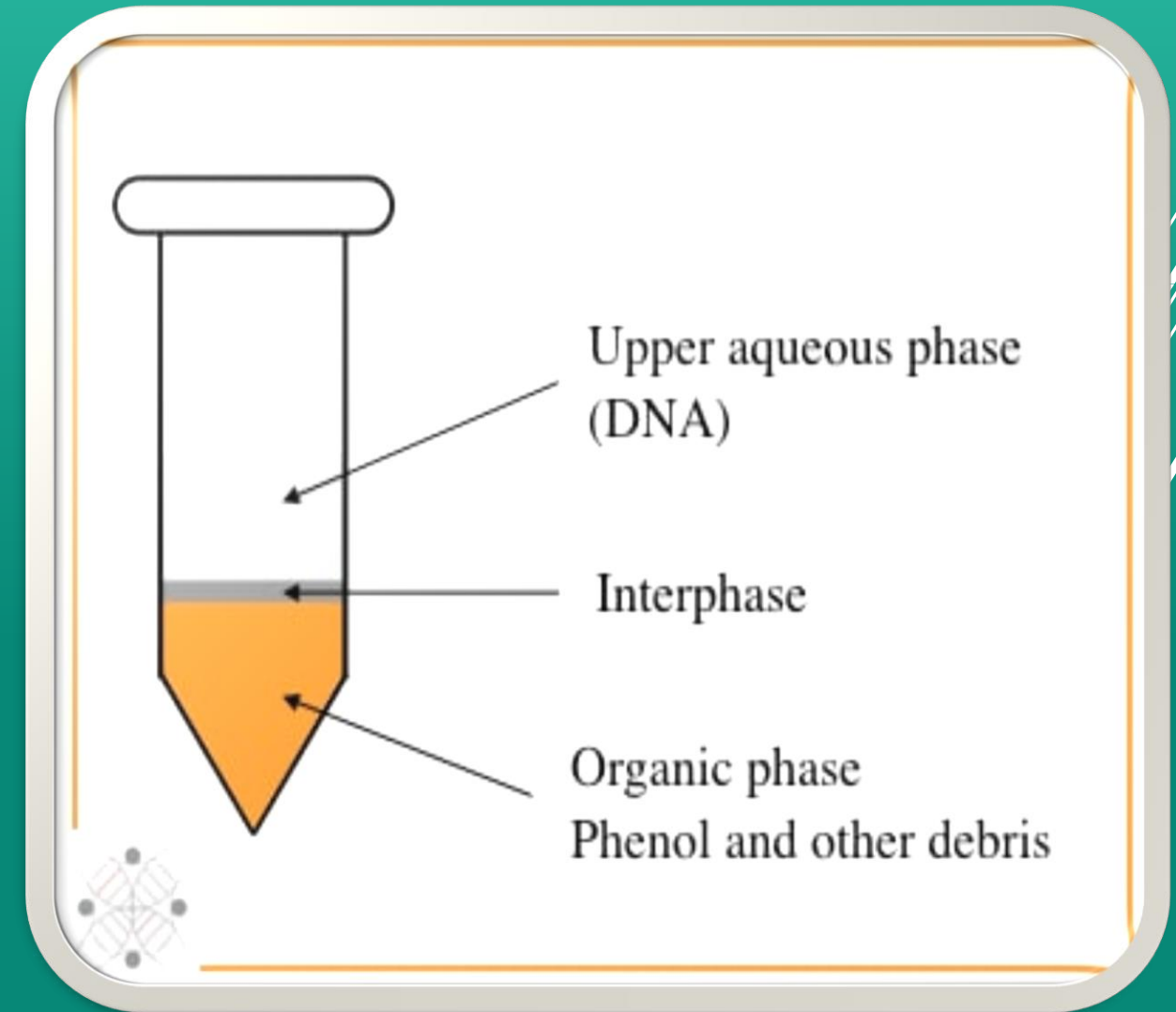
```
graph LR; A[Основные методы выделения НК] --> B[Несорбционные методы]; A --> C[Сорбционные методы]
```

Несорбционные методы

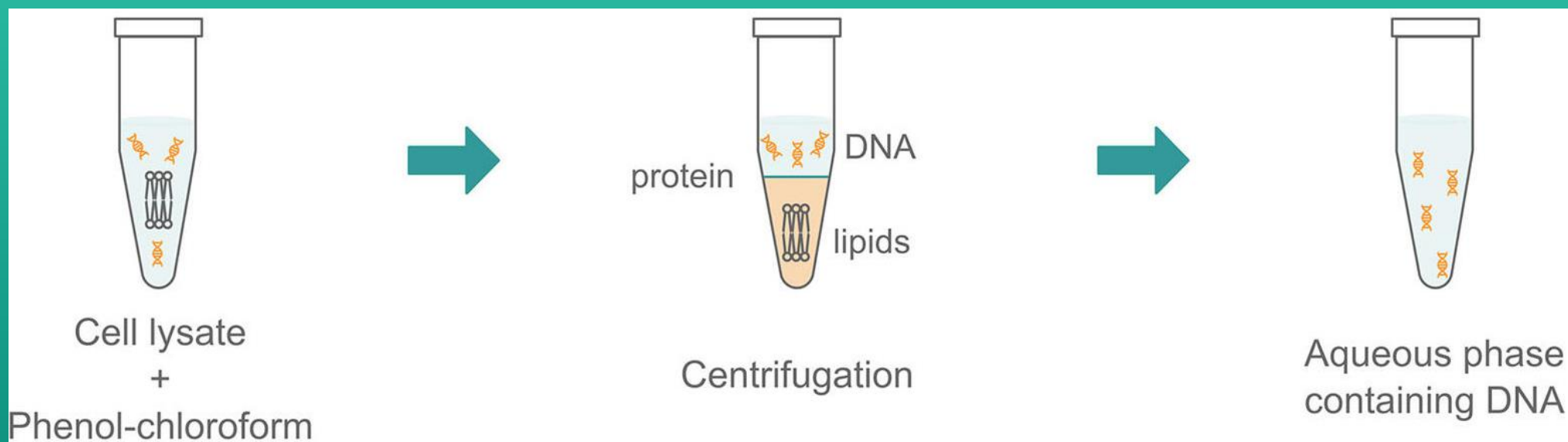
Сорбционные методы

Несорбционные методы

- 1) лизис клеток, осуществляемый путем добавления раствора, содержащего детергент / хаотроп / SDS;
- 2) инактивация ДНКаз и РНКаз, с использованием органических компонентов;
- 3) очистка ДНК и РНК, удаление липидов и белков;
- 4) экстракция очищенных нуклеиновых кислот.

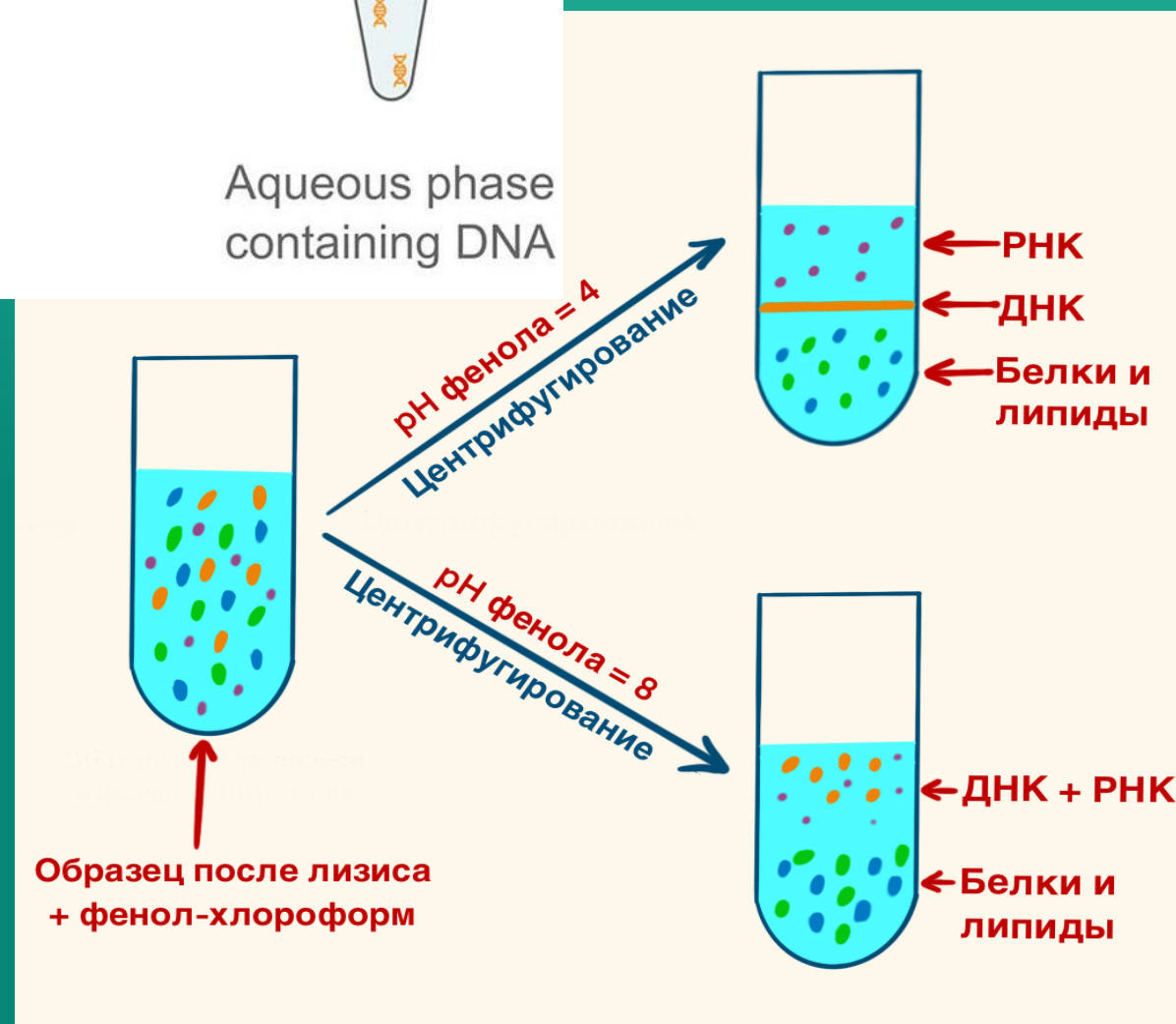


Фенол-хлороформная экстракция

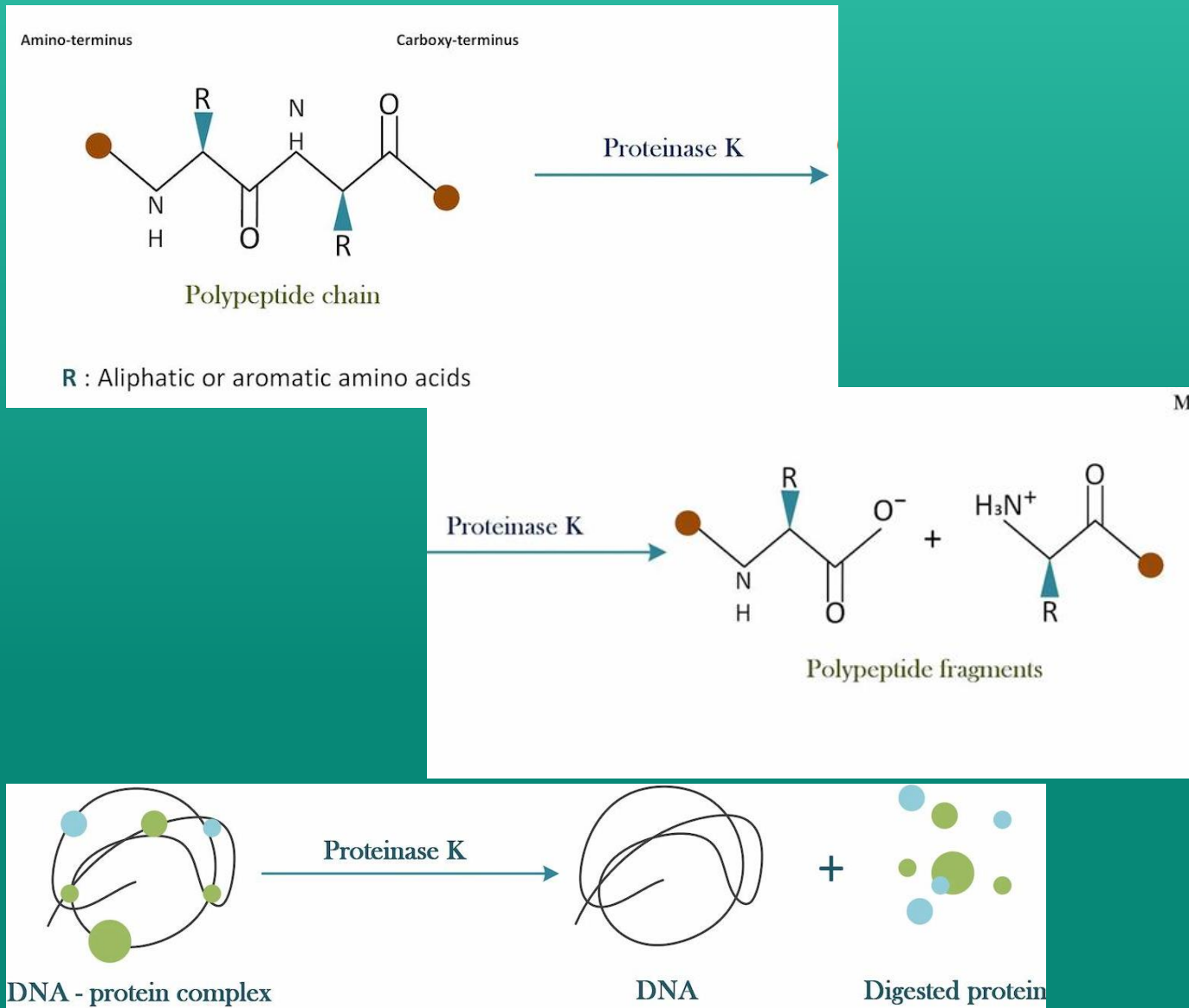


Фенол-хлороформный метод является золотым стандартом для выделения ДНК. Он обеспечивает высокий выход и является относительно недорогим.

Недостатки — токсичность реагентов (фенола и хлороформа) и, соответственно, необходимость работы в вытяжном шкафу; трудоемкость, приводящая к большей variability результатов и меньшей воспроизводимости



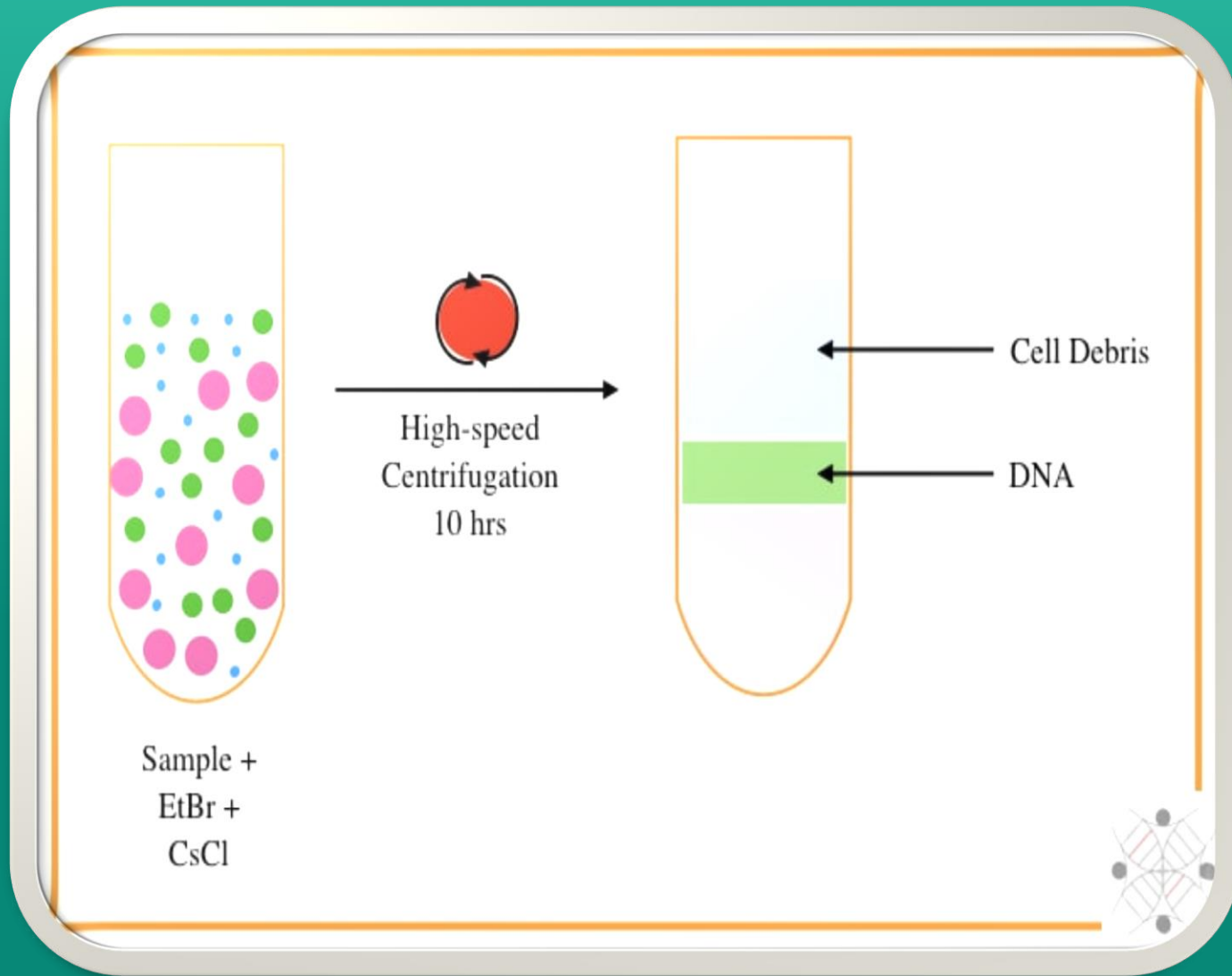
Несорбционные методы



- 1)разрушение клеток
- 2)действие протеолитическими ферментами
- 3)добавлением солей в высоких концентрациях, обычно 6 М хлорида натрия.
- 4)Центрифугирование
- 5)Отделяют супернатант, содержащий ДНК
- 6)Осаждение ДНК этанолом или изопропанолом

Чистота НК, получаемой с центрифугирования в градиенте CsCl, является эталоном, несмотря на развитие альтернативных методов очистки.

Несорбционные методы

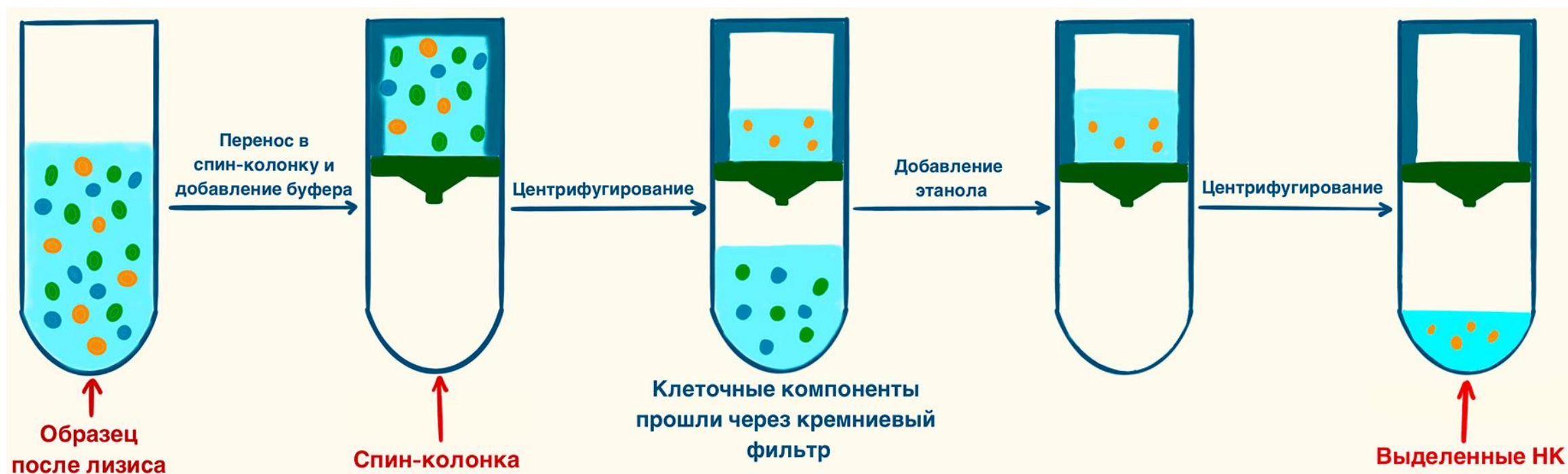


- 1)разрушение клеток
- 2)действие протеолитическими ферментами
- 3)добавлением солей в высоких концентрациях, обычно 6 М хлорида натрия.
- 4)Центрифугирование
- 5)Отделяют супернатант, содержащий ДНК
- 6)Осаждение ДНК этанолом или изопропанолом

Чистота НК, получаемой с центрифугирования в градиенте CsCl, является эталоном, несмотря на развитие альтернативных методов очистки.

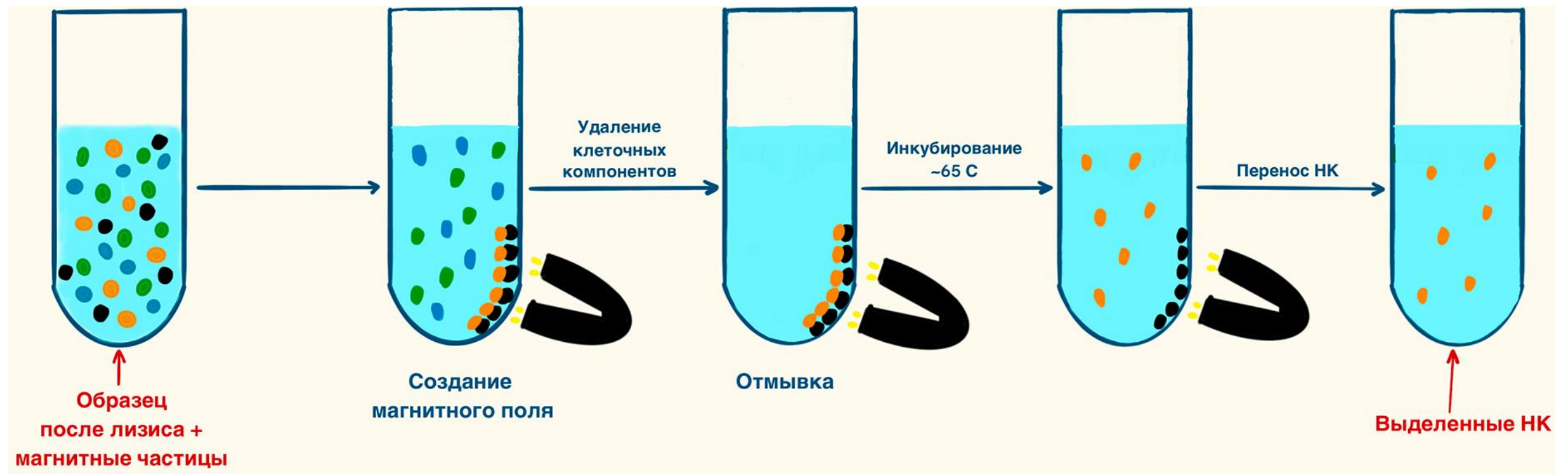
Сорбционные методы/силикатные сорбенты

Немагнитные / спин-колонки



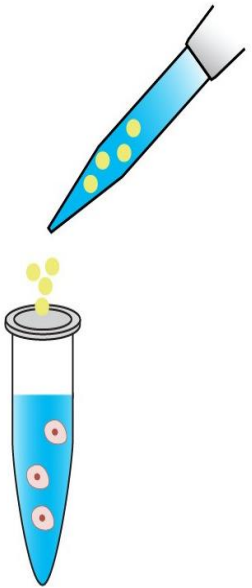
Сорбционные методы/силикатные сорбенты

магнитные



Сорбционные методы/ион-обменные сорбенты

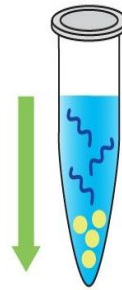
1 Add Chelex 100 suspension to sample and mix



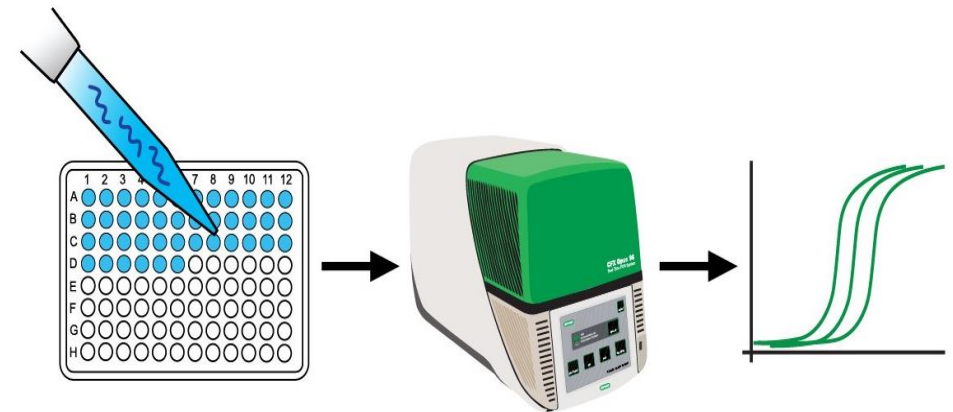
2 Heat sample e.g., at 95°C for 2-10 min



3 Separate Chelex 100 beads from sample by centrifugation, settling or filtration



4 Use supernatant in downstream step such as PCR, RT-qPCR, RT-ddPCR or RT-LAMP



**Выделение нуклеиновых кислот при помощи
Chelex 100**

Автоматические станции выделения НК



GenePure Pro 32P

- 32/48 образцов;
- образец до 1 мл;
- 96-глубоколун. планшеты и гребенки наконечников 8-канальные



GenePure Pro 96

- 96 образцов;
- образец до 1 мл;
- 96-глубоколун. планшеты и гребенки наконечников на 96-каналов.

Хранение НК

Выделенная ДНК может храниться как при низких температурах (-20°C , -80°C , -196°C), так и при комнатной температуре — в высушенном виде в присутствии стабилизаторов (DNAstable, GenTegra-DNA)

