



**ВОЛГОГРАДСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ**

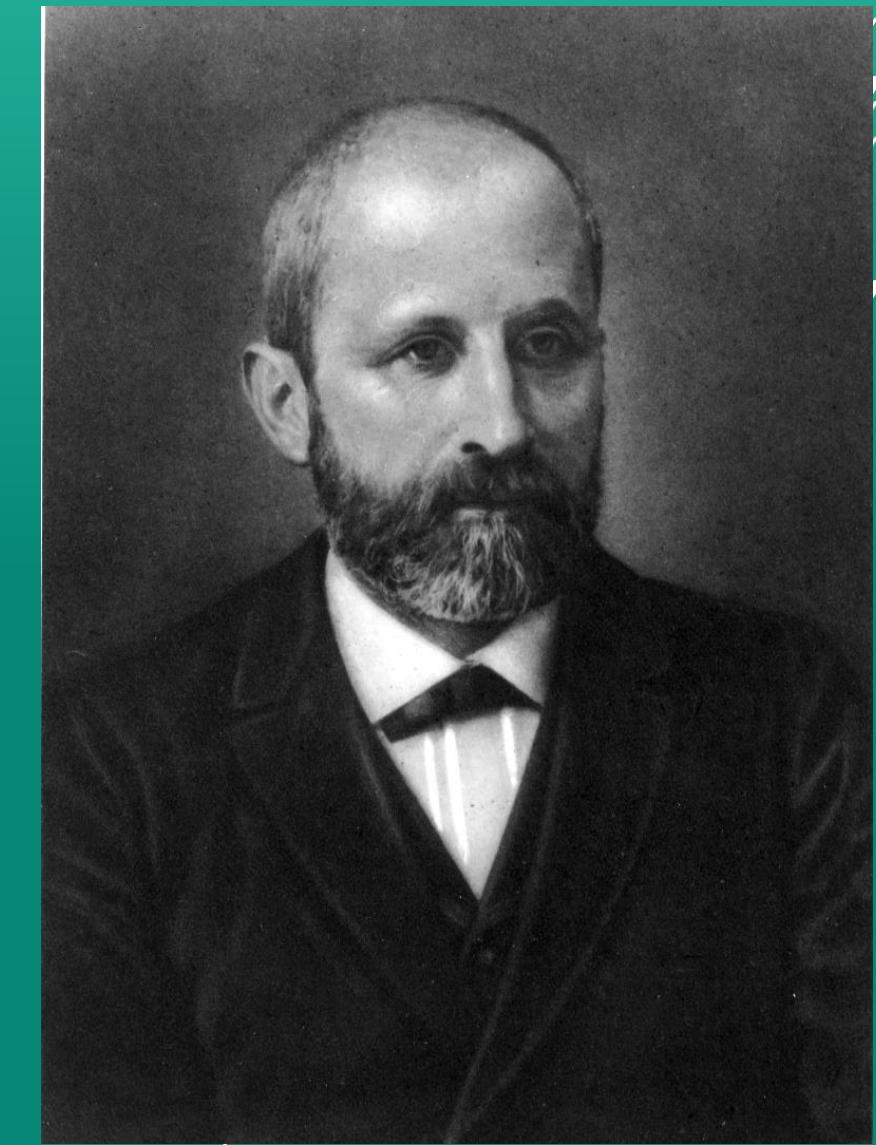
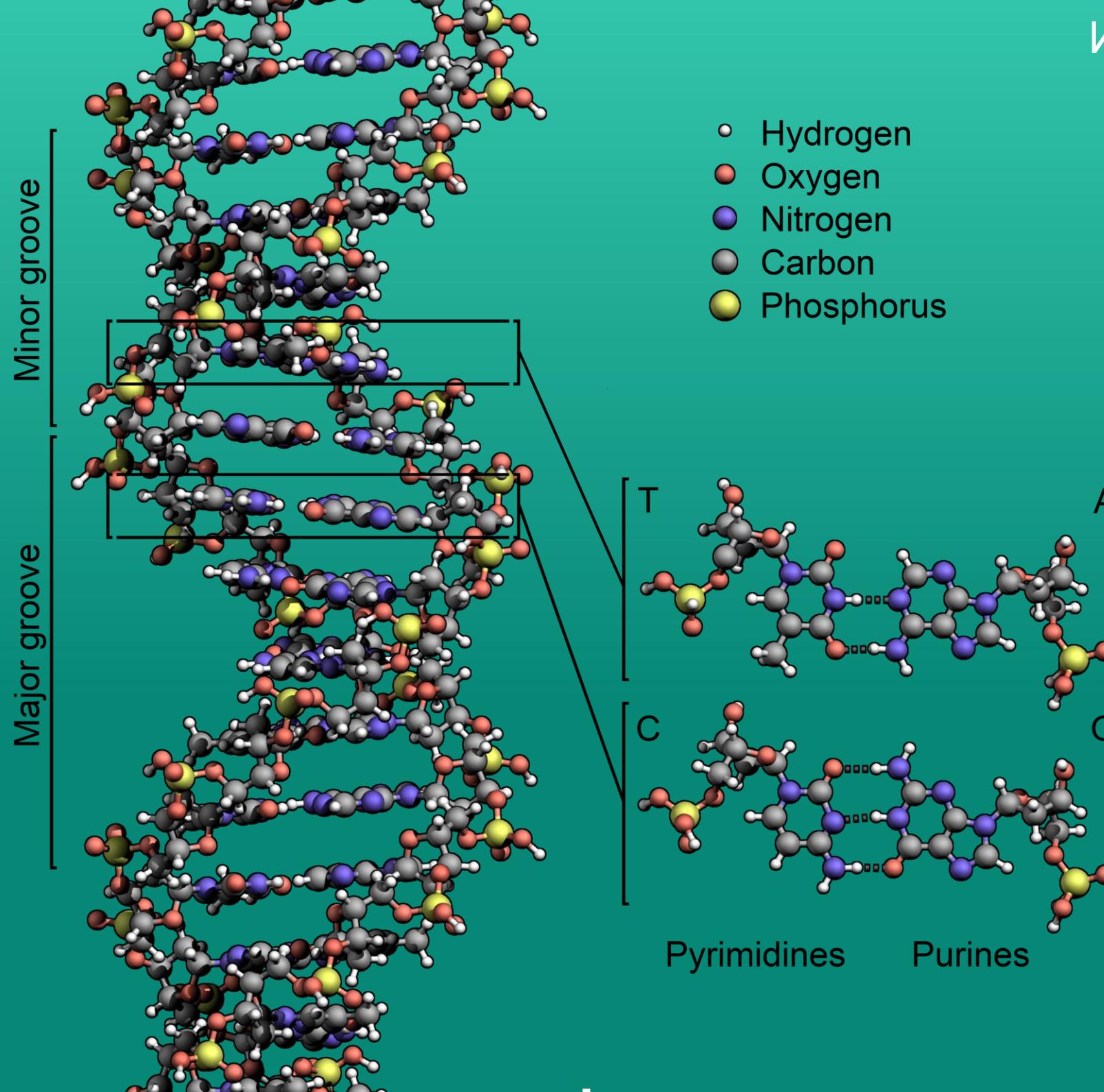
Основные методы выделения нуклеиновых кислот

ЭУК СРО по дисциплине
«Спецпрактикум»

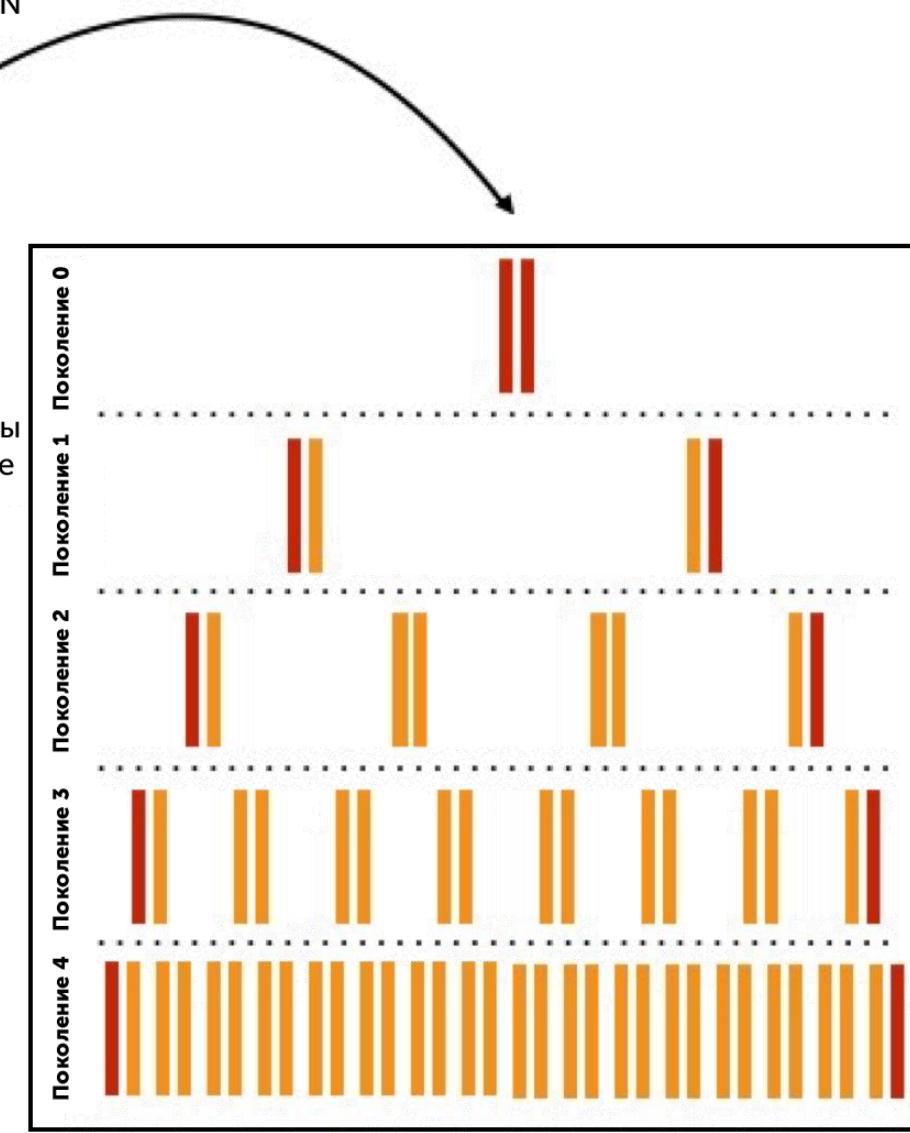
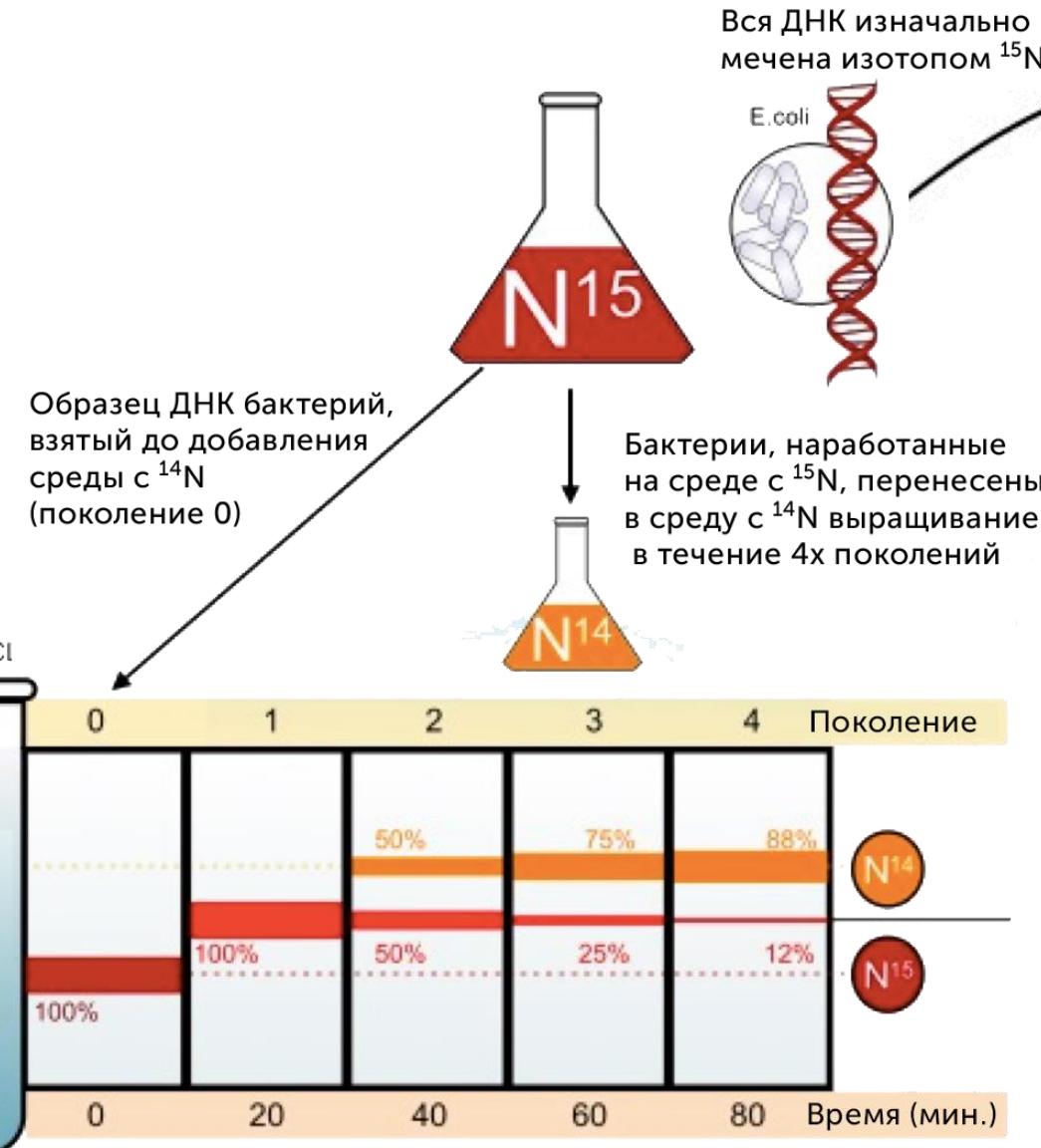
Семестр 6_раздел 1

Подготовил: ассистент кафедры
фундаментальной медицины и
биологии
Доценко Анна Михайловна

Изоляция ДНК- 1869г Фридрих Мишер



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



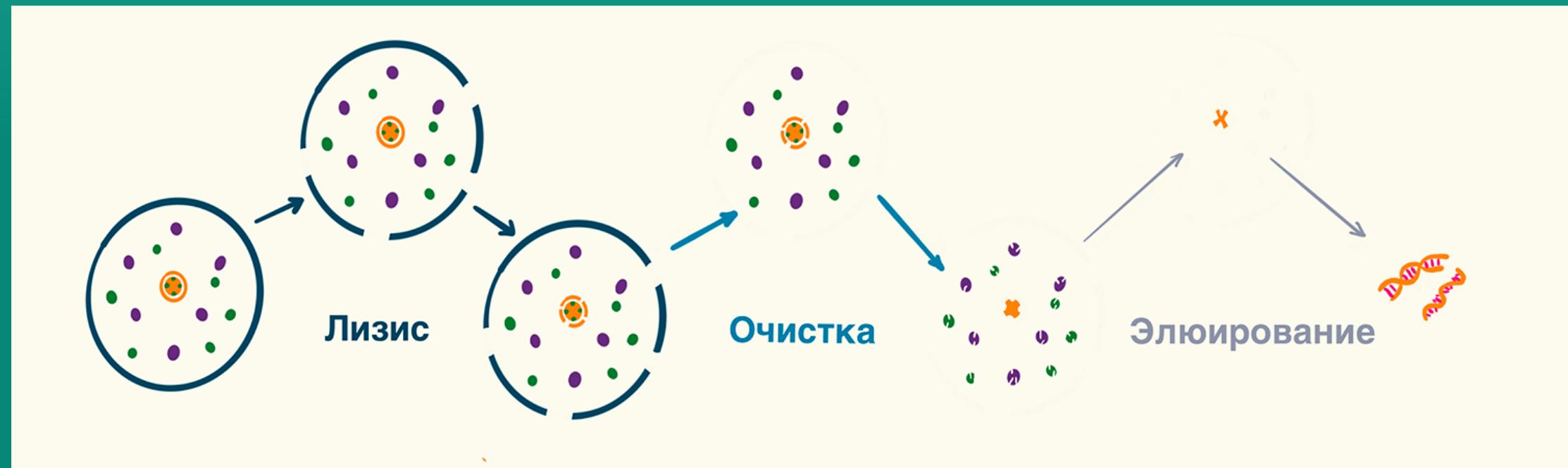
Источники геномной ДНК

В качестве образцов тканей чаще всего используют биоптаты, парафиновые блоки фиксированных формалином тканей — FFPE (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded) и образцы свежезамороженной ткани. В качестве образцов крови используют цельную кровь с этилендиаминетрауксусной 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.



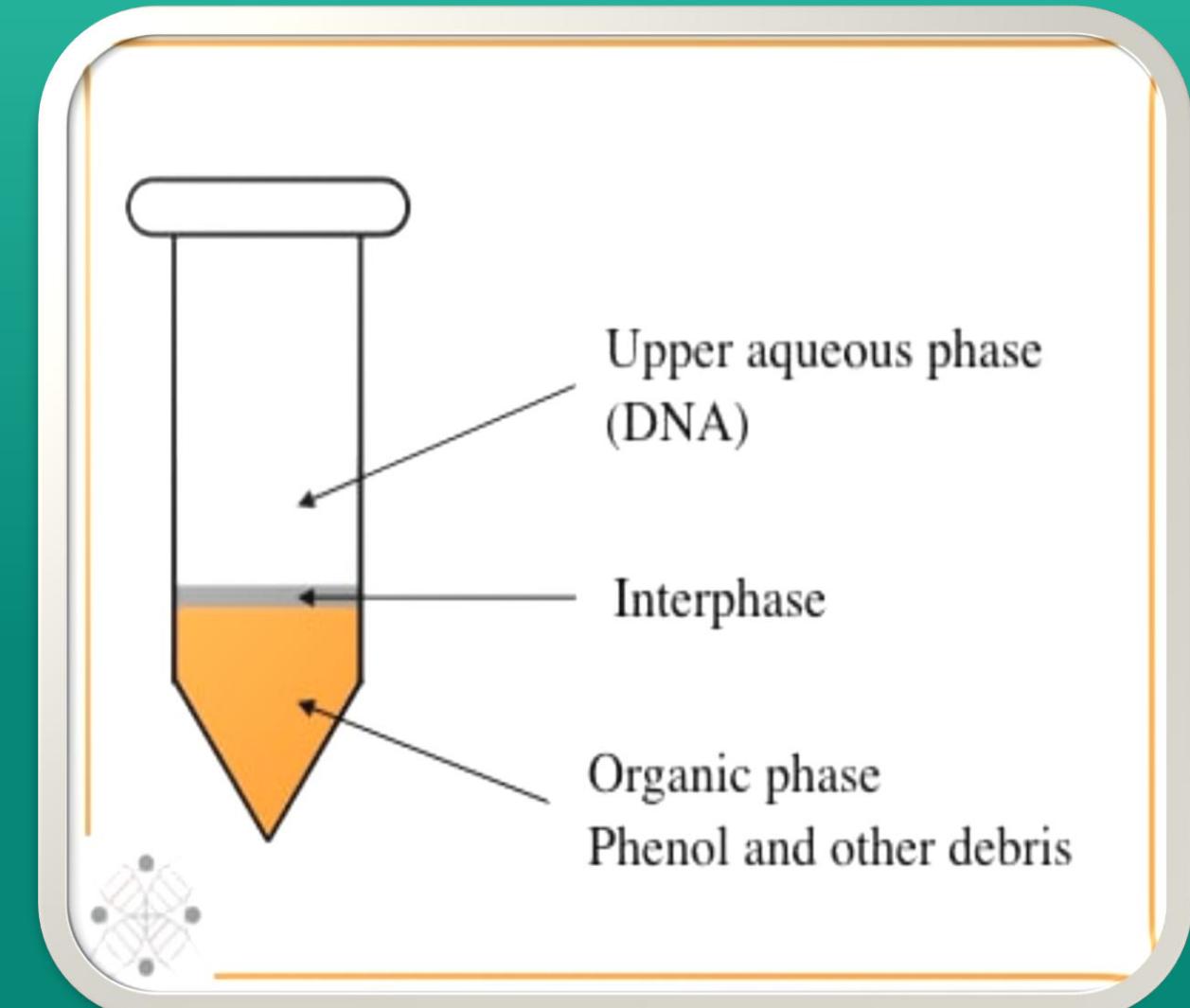
Основные методы выделения НК

Несорбционные методы

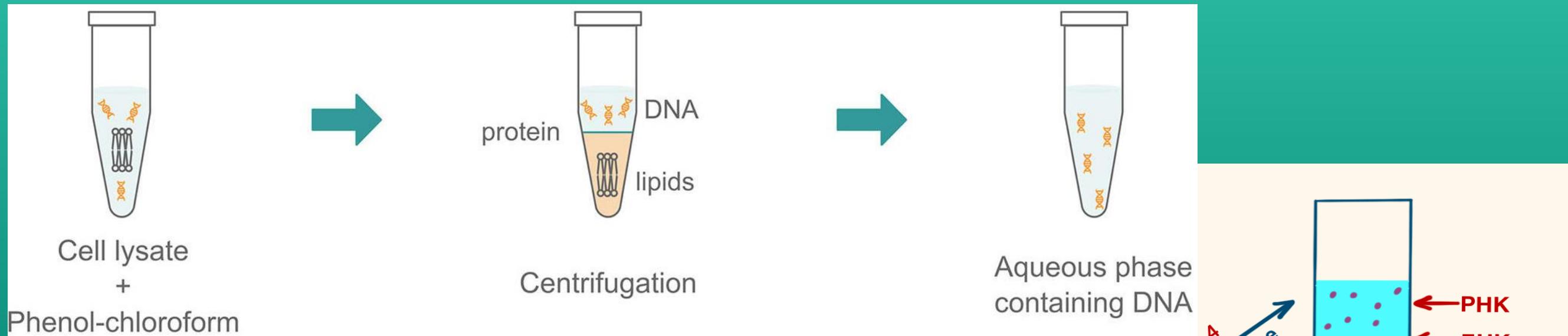
Сорбционные методы

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.

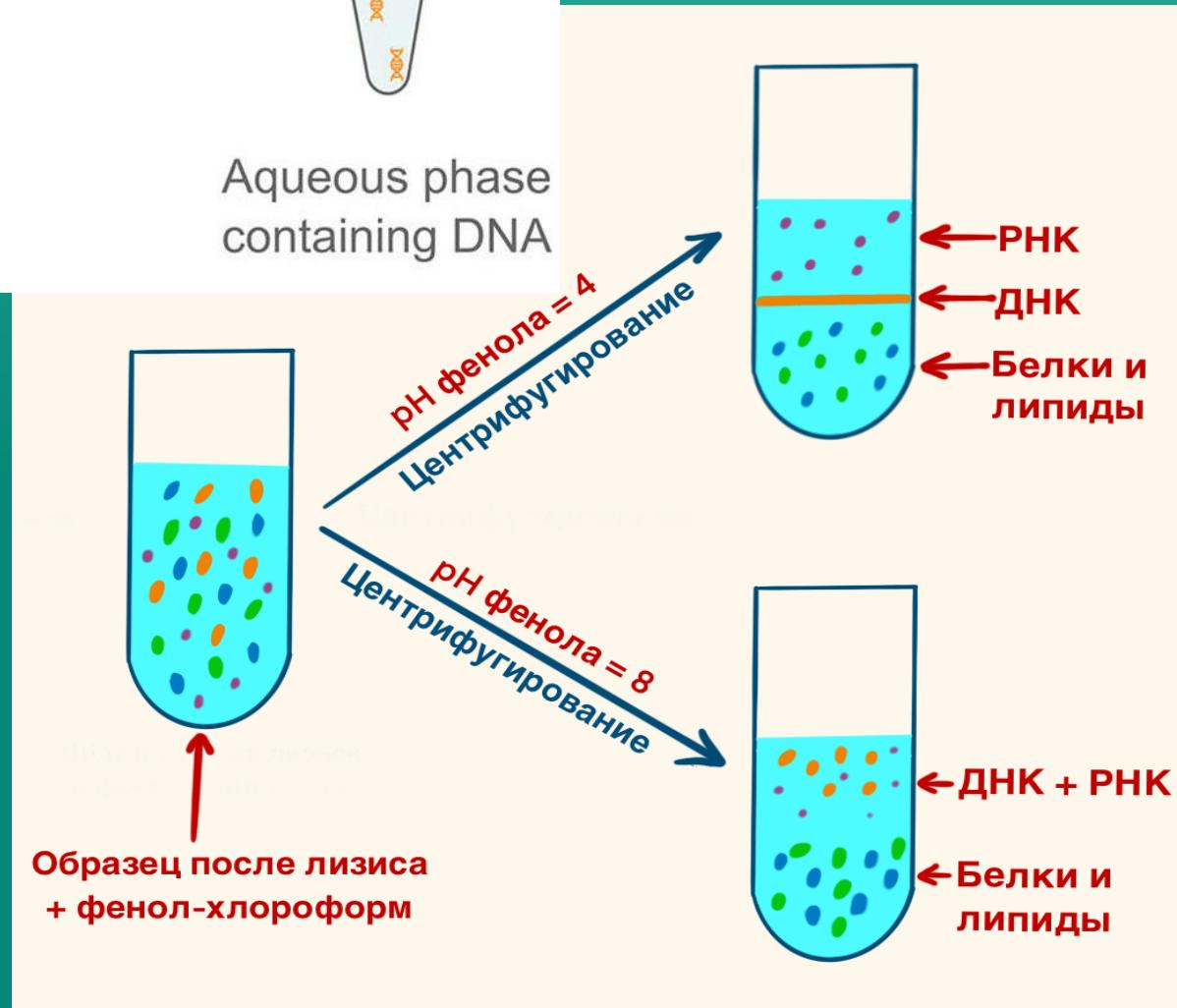


Фенол-хлороформная экстракция

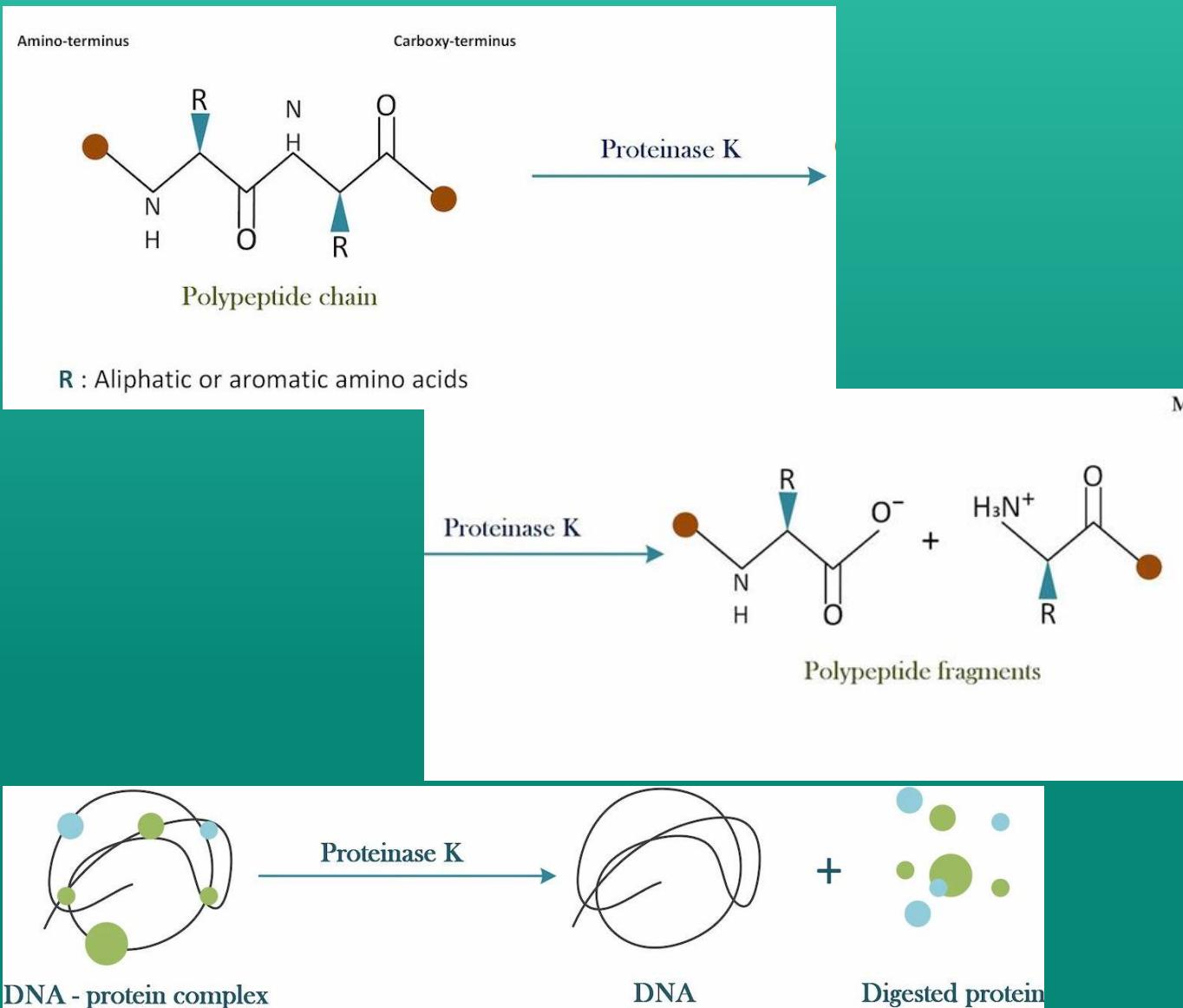


Фенол-хлороформный метод является золотым стандартом для выделения ДНК. Он обеспечивает высокий выход и является относительно недорогим.

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



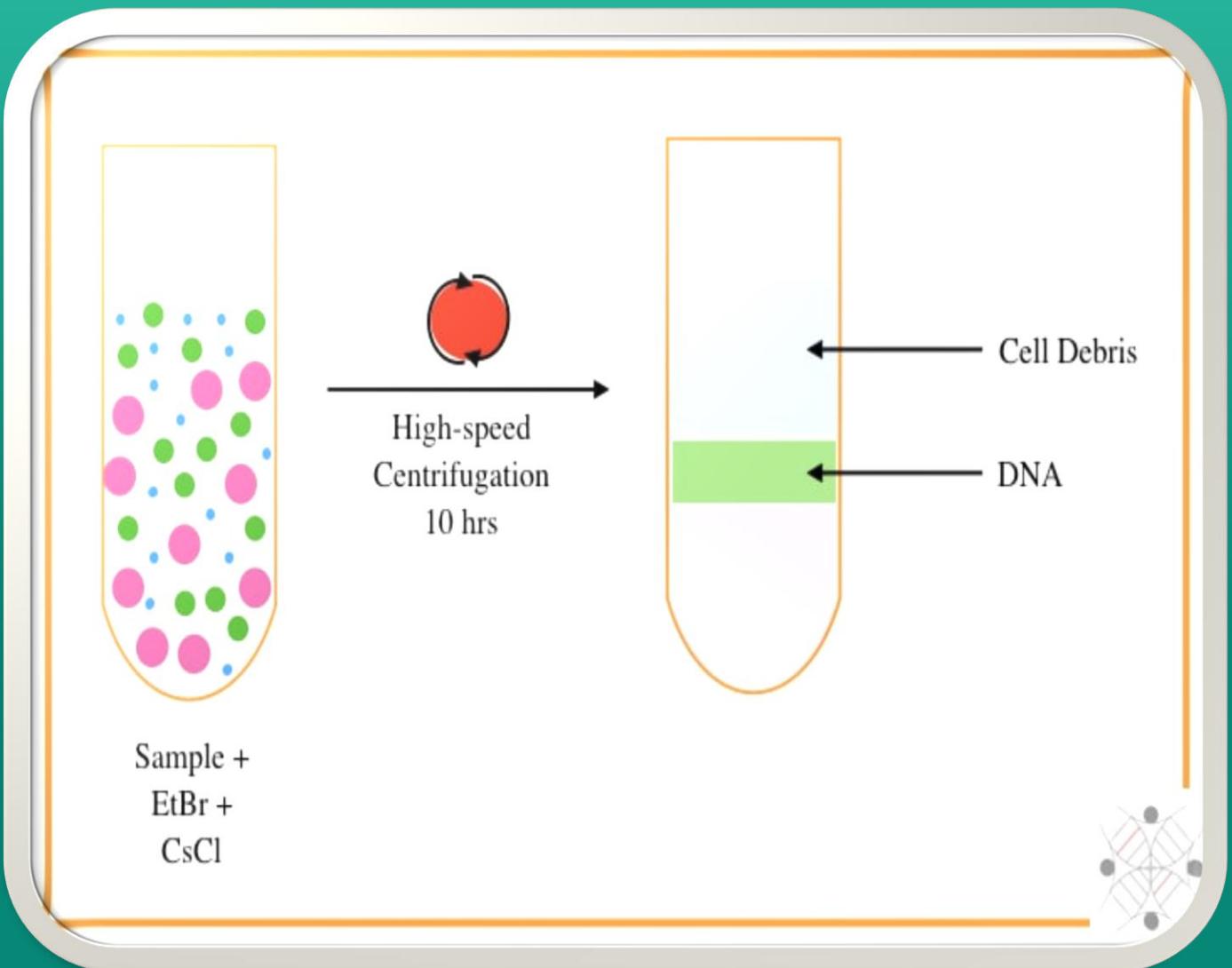
Несорбционные методы



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

Несорбционные методы

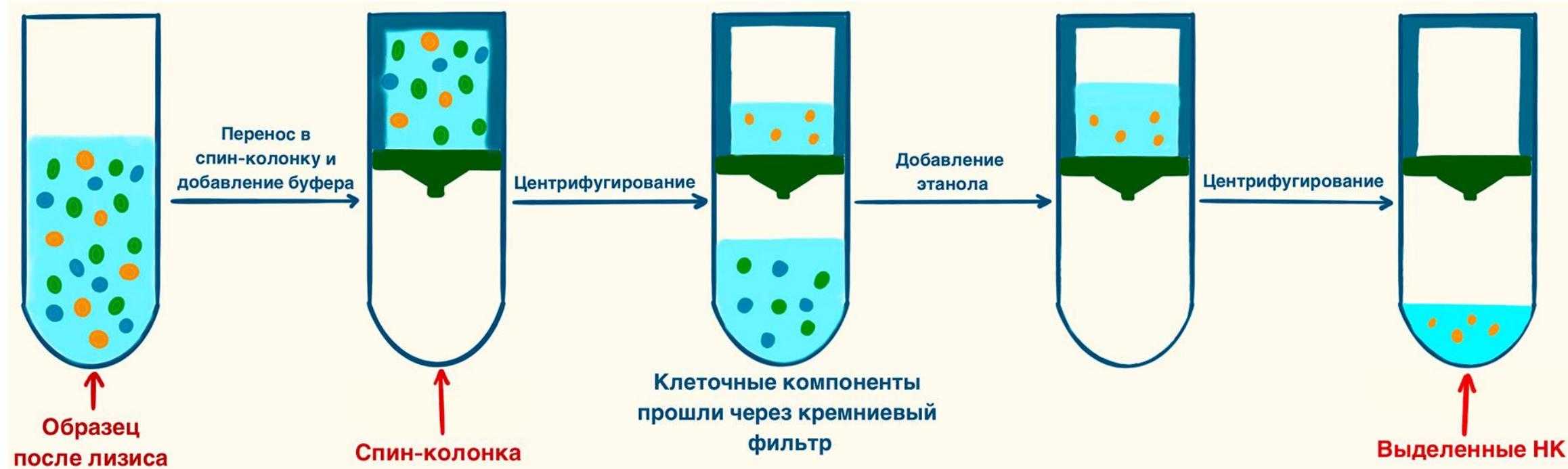


- 1) разрушение клеток
- 2) действие протеолитическими ферментами
- 3) добавлением солей в высоких концентрациях, обычно 6 М хлорида натрия.
- 4) Центрифугирование
- 5) Отделяют супернатант, содержащий ДНК
- 6) Осаждение ДНК этанолом или изопропанолом

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

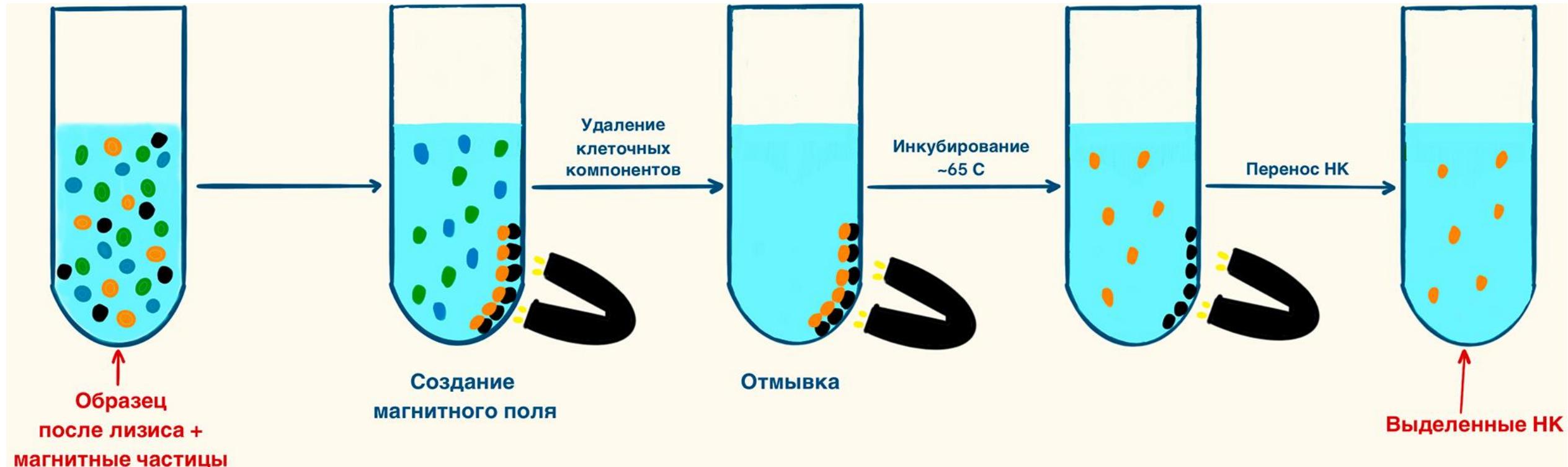
Сорбционные методы/силикатные сорбенты

Немагнитные / спин-колонки



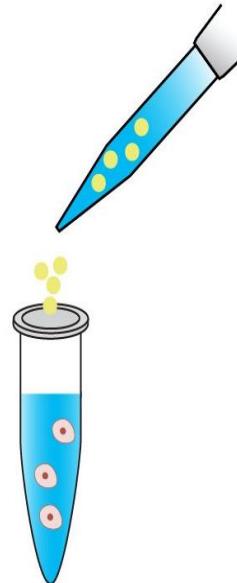
Сорбционные методы/силикатные сорбенты

магнитные



Сорбционные методы/ион-обменные сорбенты

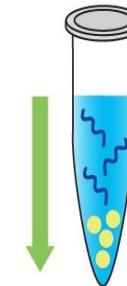
1 Add Chelex 100 suspension to sample and mix



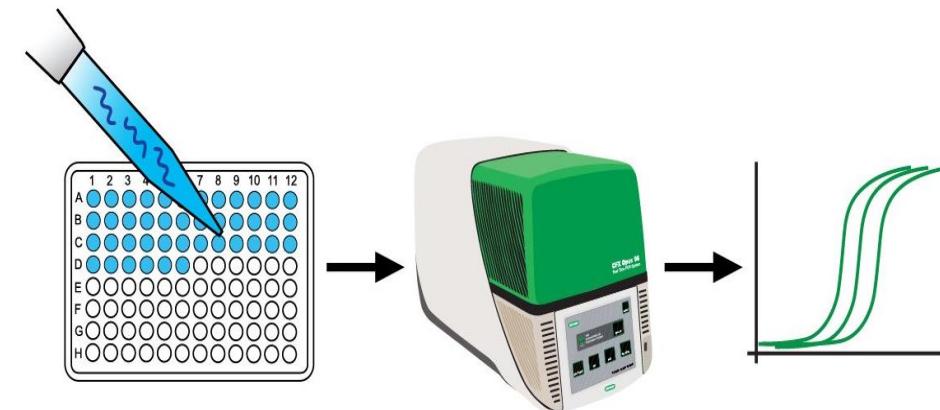
2 Heat sample
e.g., at 95°C
for 2-10 min



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)

