ЗАНЯТИЕ № 9 (Семинарское).

**Тема: Выделение нуклеиновых кислот.**

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

1. Этапы выделения нуклеиновых кислот.
2. Фенольный метод выделении НК.
3. Щелочной метод выделения НК.
4. Выделение НК с использованием протеиназы К.
5. Выделение НК с использованием гуанидинтиоционата.

**Краткое содержание занятия:**

Основные методы выделения нуклеиновых кислот (фенольный, щелочной, с использованием протеинкиназы К, гуанидинтиоционата и др.).

ДНК может быть изолирована из любого типа клеток и тканей, содержащих ядра. При этом, чтобы проводить дальнейший молекулярный анализ НК, необходимо добиться выделения ее в чистом виде.

Большинство методов выделения НК состоят из следующих этапов:

1 – Лизис клетки с последующим разрушением ядерной мембраны и выделением ядерной ДНК. Обычно, это достигается путем использования физических или химических методов дезинтегрирования клеток.

2 – удаление липидов мембран путем добавления детергентов, хелатообразователей, хаотропных агентов.

3 – удаление (осаждение) белков.

4 – селективное выделение нужной НК.

5 – осаждение выделенной НК этанолом или изопропанолом.

Каждый из существующих методов использует дополнительные этапы, которые позволяют добиться выделении искомой НК в чистом виде.

1. Фенольный метод выделении НК.

Фенол не смешивается с водой, поэтому образуется двойная фаза, причем, фенол как более плотная жидкость, спускается на дно пробирки. Затем, пробирку начинают интенсивно встряхивать, добиваясь получения мелкодисперсной эмульсии.

При этом, белки, как неполярные соединения хорошо растворяются в органических неполярных растворителях, таких как фенол, а НК, являясь отрицательно зараженной молекулой лучше взаимодействует с полярными молекулами воды. Далее, пробирку центрифугируют, добиваясь осаждения эмульсии и образованием четкой границы раздела фаз. При этом, белки с фенолом спускаются вниз, а в верхней водной фазе находится НК.

Далее, пипеткой отделяют верхнюю фазу, содержащую НК, которую затем осаждают путем добавления этанола.

2. Щелочной метод выделения НК.

Данный метод, разработанный Birnboim и Doly, включает в себя щелочной лизис клеток. Этот метод базируется на использовании гидроксида натрия и SDS, с последующей нейтрализацией высоких значений pH ацетатом калия. Это обеспечивает селективное осаждение ДНК, белков и др. клеточных элементов, причем, плазмидная ДНК остается в водной фазе.

3. Выделение НК с использованием протеиназы К.

Данный метод, разработанный Блином и Стаффордом, основан на использовании протеиназы К, которая расщепляет белки в присутствии ЭДТА. При этом белки теряют свою нативную комформацию за счет удаления ионов Са2+, а становясь менее устойчивы к действию протеиназы К. Она селективно расщепляет пептидную связь между алифатическими и ароматическими аминокислотами, что приводит к образованию олигопептидов, связывающихся с органической фазой фенола/хлороформа. Важной особенностью этого фермента является то, что он устойчив в широком диапазоне pH (4-12), активен в присутствии денатуратов (SDS), хелатирующих агентов (ЭДТА), а также протеолитических ферментов. При этом, протеиназа К эффективно инактивирует ДНКазу и РНКаза. Минус данного метода заключается в том, что инкубирование образка с протеиназой К длится до 16 часов, а все выделение занимает 1-2 дня.

4. Выделение НК с использованием гуанидинтиоционата.

Гуанидинтиоизоцианат является сильным хаотропным агентом, который одновременно производит лизис клеток и денатурирует все клеточные белки, включая РНКазу. Поскольку, РНК является менее плотной молекулой, по сравнению с ДНК, то ее можно выделить путем центрифугирования в градиенте плотности CsCl.

Почему для выделения РНК используют именно этот метод?

Дело в том, что РНК является более лабильной и чувствительной к действию нуклеаз. Помимо этого, РНК более устойчива к денатурирующим белок веществам, чем ДНК. Поэтому, необходимо проводить одновременный лизис клетки с инактивацией РНКаз.

 В ходе этого РНК не разрушается благодаря своим небольшим размерам и устойчива к механической и химической деградации.

5. Выделение НК с использованием ингибиторов РНКазы: ванадилрибонуклеозидные комплексы и РНКазин.

6. Горячий фенольный метод с использованием гуанидина.

7. Метод с использованием гуанидина и хлористого цезия.

8. Получении поли (А)+ - РНК в методе абсорбционной хроматографии.