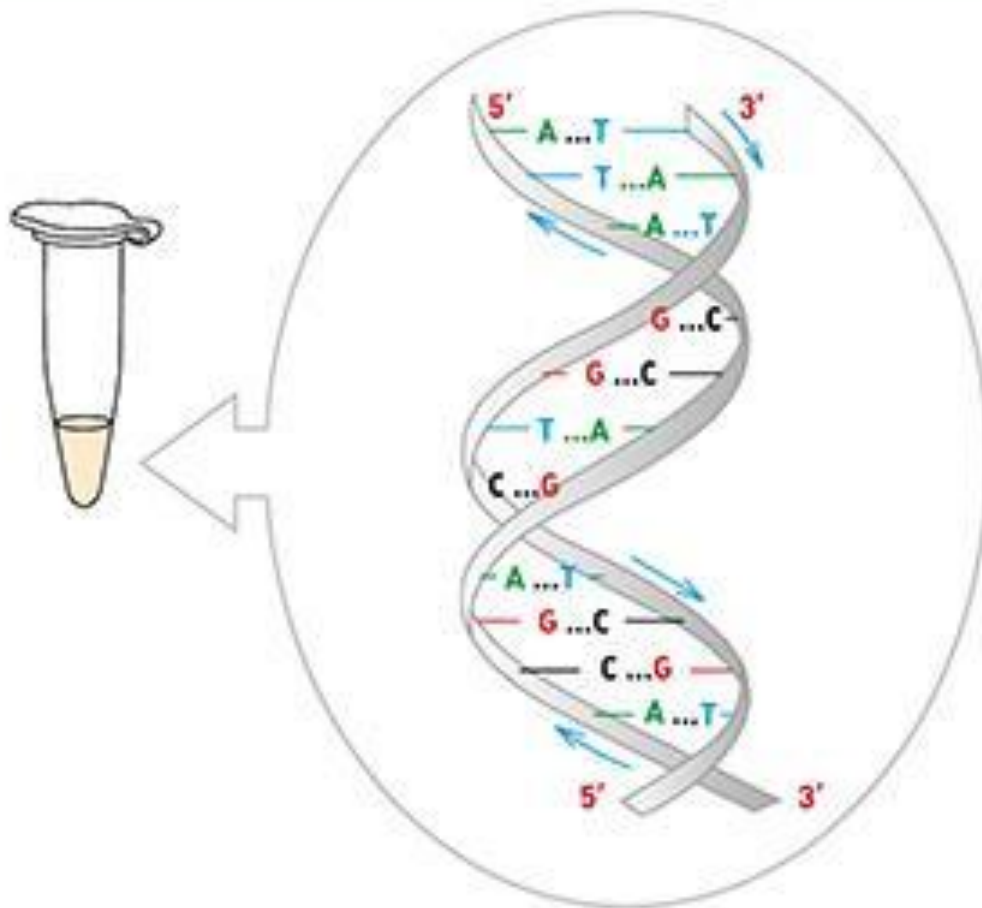


ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК

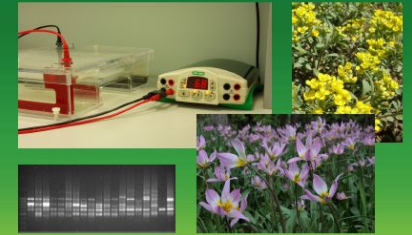


Литература

Н. А. КУТЛУНИНА
А. А. ЕРМОШИН

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ
МЕТОДЫ В ИССЛЕДОВАНИИ
РАСТЕНИЙ

Учебно-методическое пособие



- Кутлунина Н.А., Ермошин А.А. Молекулярно-генетические методы в исследовании растений : учеб.-метод. пособие. М-во образования и науки Рос. Федерации, Урал. федер. ун-т. – Екатеринбург : Изд-во Урал. ун-та, 2017. – 142 с.
- Методы выделения ДНК из биологического материала <https://vmtbio.ru/isolation-dna/>

Работа с реактивами

- Обращайте внимание на маркировку.
- Используйте только подписанные реактивы.
- При необходимости отмечайте дату вскрытия емкости с реактивом для учета длительности хранения.
- На банке с реактивом указывают:
 - Название и молекулярная формула;
 - Каталожный номер и название фирмы;
 - Номер партии;
 - Дата, до которой продукт годен к употреблению;
 - Условия хранения.



Взвешивание

Если при взвешивании реактив (объект) попал на весы: **НЕ НАДО ЕГО СДУВАТЬ!**

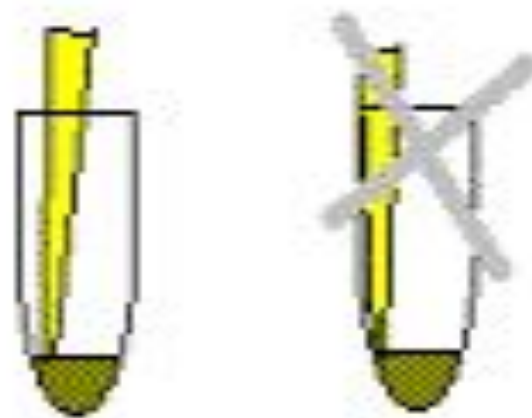
Следует

- аккуратно снять чашку (и, если надо, верхний кожух весов);
- вымыть кожух и насухо его протереть;
- весы протереть влажной тряпкой/салфеткой, насухо вытереть;
- всё собрать.



Автоматическая пипетка

- Внимательно работайте с горячими, холодными, вязкими растворами и растворами с небольшим поверхностным натяжением.
- Отбор неправильного объёма жидкости (некачественный наконечник, не сразу коснулся жидкости, закупорился). Следует контролировать работу пипетки "на глаз".
- Обращайте внимание, чтобы наконечник не касался ничего лишнего своей внешней поверхностью.



Автоматическая пипетка

Правила работы:

- Отжать пипетку до первого упора;
- Отбирать жидкость с поверхности, наконечник глубоко не опускать;
- Выдавливать жидкость, отжав пипетку до второго упора (по возможности на стенку пробирки или на поверхность жидкости).



Для того чтобы жидкость не попала внутрь автоматической пипетки:

- Плавно отпускать поршень вверх;
- Не класть на стол пипетку с надетым наконечником;
- Не сбрасывать наконечник с жидкостью.



GenFollower
1000ul (Long) FILTER TIP
Extended Length, Graduated Stemmed,
Free of Phthalate, Phthalate and DNA,
Non-proprietary

GenFollower
200ul (Long) FILTER TIP
Extended Length, Graduated Stemmed,
Free of Phthalate, Phthalate and DNA,
Non-proprietary

GenFollower
200ul
Short Stemmed, Graduated Stemmed,
Free of Phthalate, Phthalate and DNA,
Non-proprietary

GenFollower
100ul (Long) FILTER TIP
Extended Length, Graduated Stemmed,
Free of Phthalate, Phthalate and DNA,
Non-proprietary

**Для
использованного
пластика.**



Ламинар-бокс

- Лабораторный прибор для работы с биологическими объектами в стерильных условиях.
- Шкаф, оборудованный осветителями, ультрафиолетовыми лампами и системой подачи стерильного воздуха.
- Используется в микробиологических, молекулярно-биологических работах, работах с культурой клеток, тканей и органов.



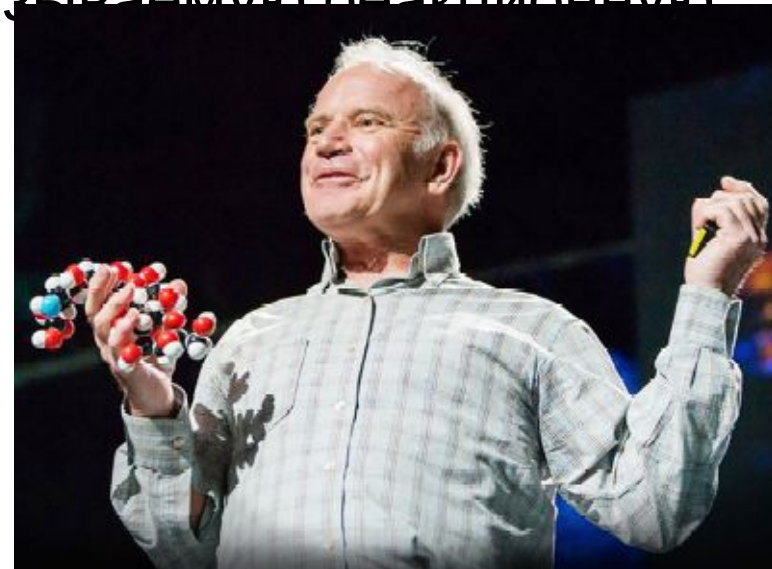
Зачем выделять НК?

- Выделение ДНК и РНК — важный шаг подготовки проб перед биохимическими и диагностическими процессами.**
- Амплификация, проведение обратной транскрипции, детектирование накопления продуктов амплификации методом ПЦР в реальном времени, клонирование, синтез ДНК и др. процедуры, выполняют на биологических образцах с предварительно выделенными и очищенными нуклеиновыми кислотами (НК).**

ПЦР

- **ПЦР (полимеразная цепная реакция)** представляет собой реакцию синтеза комплементарной цепочки ДНК на ДНК матрице, катализируемую ферментом ДНК-зависимой ДНК-полимеразой.
- **Фермент термостабильный** – он может выдерживать высокие температуры, необходимые на этапе денатурации. Оптимум работы полимеразы составляет около 72°C. Для создания оптимальных условий синтеза образец ДНК помещается в так называемую реакционную смесь .

**Американский биохимик
Кэрри Муллис –
нобелевский лауреат 1993 г.
в области химии
(совместно с
Майклом Смитом) за
изобретение ПЦР**



Ингибиторы ПЦР

Изменяют конформацию фермента, уменьшают его

Ингибитор	Концентрация ингибитора
SDS	> 0.005%
Фенол	> 0.2%
Этанол	> 1%
Изопропанол	> 1%
Ацетат натрия	> 5 mM
Хлористый натрий	> 25 mM
EDTA	> 0.5 mM
Гемоглобин	> 1 мг/мл
Мочевина	> 20 mM
Агароза (выделении ДНК из геля)	> 1%
РНК	> 0,5 мкг/20мкл
Реакционная смесь	> 15%

Способы выделения НК

- **осаждение НК на суспензионный носитель;**
- **выделение на колонках.**

Традиционные методы выделения являются надежными и прошли испытание временем, но сейчас на рынке имеется широкий ассортимент товаров, включая полные наборы, содержащие большинство реагентов, необходимых для выделения нуклеиновых кислот.

Большинство из них все же требует многократных этапов центрифугирования, которые сопровождаются удалением супернатанта. В последний годы повысился спрос на автоматические системы (выход НК и чистота материала, воспроизводимость и прогностичность

Способы выделения НК

<https://vmtbio.ru/isolation-dna/>

- Фенол-хлороформная экстракция (Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction).
- ФТА-карты.
- **С помощью коммерческих наборов (KITs)**
- Силикатные носители (Силика, Silica Matrices).
- Стеклянные носители (Glass Particle).
- Диатомит.
- Очистка нуклеиновых кислот с использованием магнитных микроносителей (Magnetic Bead Based Nucleic Acid Purification).
- Анионообменные смолы.

Растительный материал для выделения ДНК

- Выделять ДНК можно из свежих или замороженных (при минус 70–80 °С) растительных образцов, **из частей растений, высушенных в силикагеле, или из гербарных образцов.**
- Для выделения ДНК обычно используют листья растений.
- При выборе частей растения для выделения ДНК нужно выбирать участки, не пораженные грибковыми и другими заболеваниями, чтобы избежать загрязнения проб чужеродной ДНК.

Особенности выделения ДНК из растительных объектов

- При выделении ДНК из растительных объектов необходимо дезактивировать клеточные ферменты, «удалить» запасные вещества (полисахариды), вторичные метаболиты: алкалоиды, фенольные соединения, терпены, которые мешают выделению ДНК и отрицательно влияют на её качество**
- В связи с многообразием метаболитов у представителей различных таксонов, а иногда и представителей одного рода растений, единого оптимального протокола**

Особенности выделения ДНК из растительных объектов

В целом выделение ДНК включает обязательные процедуры:

- разрушение клеток или лизис;**
- удаление мембранных липидов;**
- удаление вторичных метаболитов и запасных веществ;**
- удаление белков;**
- удаление РНК;**
- осаждение ДНК;**
- растворение ДНК (хранение).**

После экстракции целесообразно проверить качество выделенной НК, например, измерить концентрацию с помощью флюориметра/спектрофотометра, провести гель-электрофорез или ПЦР со специальными праймерами факторами элонгации.



Флуориметр Qubit

Список оборудования для выделения ДНК

- Растительная ткань (замороженная жидким азотом, свежая или высушенная)
- **Набор реагентов**
- Центрифуга для микропробирок
- Вортекс (встряхиватель)
- Микропипетки (20, 200, 1000 мкл) и наконечники к ним
- Штатив для пробирок объемом 1.5 или 2.0 мл
- Микропробирки объемом 1.5 или 2.0 мл
- Термостат
- Перчатки одноразовые медицинские

СИНТОЛ

EX-513-100

ДНК-ЭКСТРАН-3

**НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ
ГЕНОМНОЙ ДНК ИЗ РАСТЕНИЙ**

Набор реагентов предназначен для выделения геномной ДНК из образцов зеленых тканей растений. Выход ДНК составляет 3-4 мкг из 10 мг ткани. Чистота ДНК $A_{260/280}$ 1.8-1.9

Состав набора

на 100 проб

№	Название	Описание	Кол-во
1	РНКаза 10 мг/мл	Фермент для удаления РНК, 0.3 мл	1
2	Лизирующий раствор 2	Реагент для лизиса клеток, 32 мл	1
3	Осаждающий раствор 1	Реагент для осаждения белков, 11 мл	1
4	Осаждающий раствор 2	Реагент для осаждения ДНК, 32 мл	1
5	Промывочный раствор	Реагент для промывки ДНК, 42 мл	1
6	Элюирующий раствор	Реагент для растворения ДНК, 11 мл	1

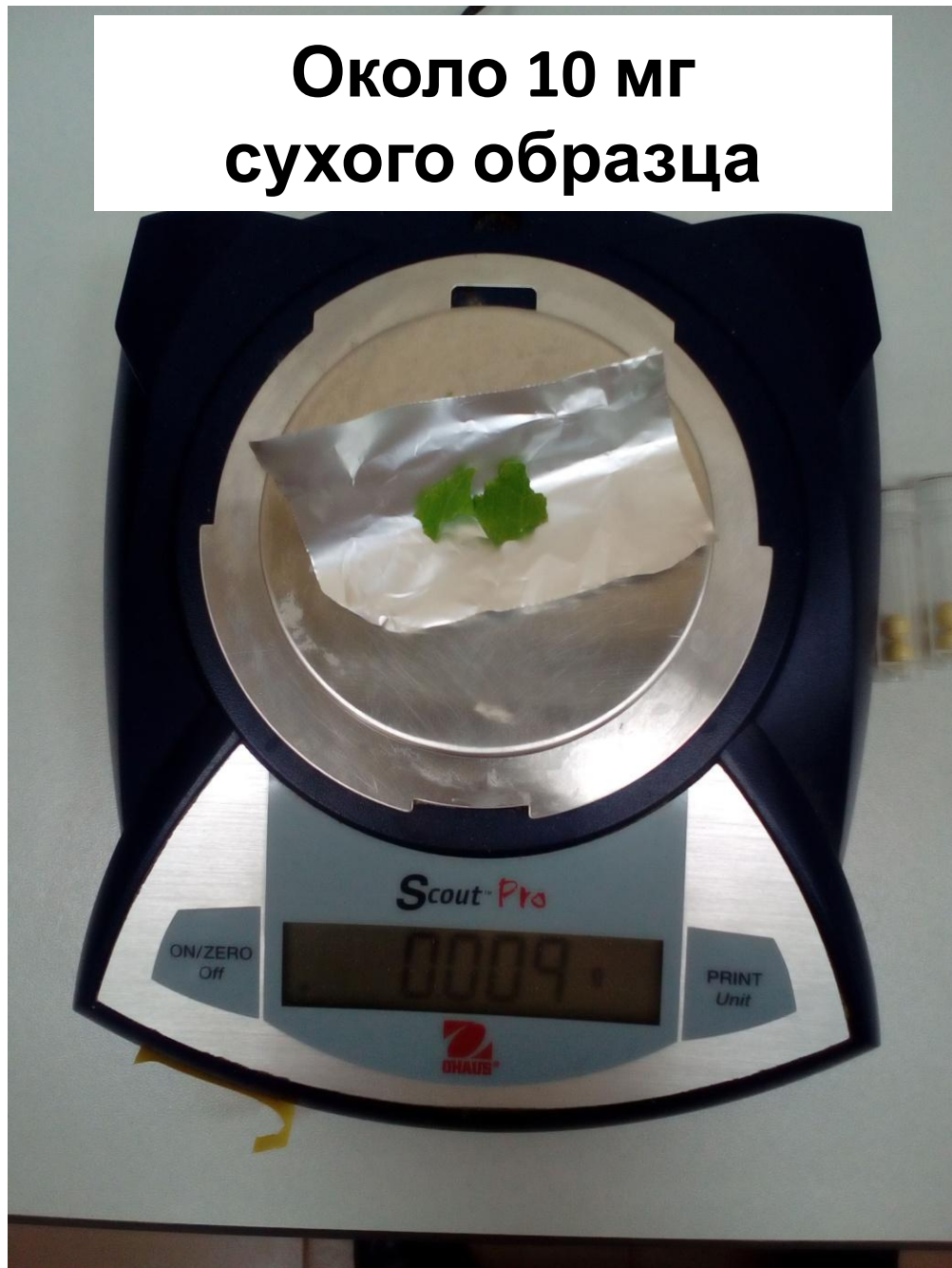
1 мл = 1000 мкл

1. Внесение образца

1.1. Промаркировать необходимое количество пробирок объемом 1,5 или 2 мл в соответствии с количеством анализируемых проб и дополнительной пробиркой для отрицательного контроля выделения «ОКО-В». Во все пробирки (кроме «ОКО-В») внести 10-30 мг свежей или замороженной ткани



**Около 10 мг
сухого образца**





2. Лизис клеток

- 2.1. В каждую пробирку добавить 20 мкл *Лизирующего раствора (№2)* и максимально растереть ткань в микропробирке тефлоновым пестиком. Добавить 280 мкл *Лизирующего раствора (№2)*.
- 2.2. Внести в пробирки по 3 мкл раствора *РНказы (№1)* и перемешать на вортексе.
- 2.3. Инкубировать 1 час при температуре 60°C. Остудить пробирки до комнатной температуры.

Не забыть:

Перчатки одеть

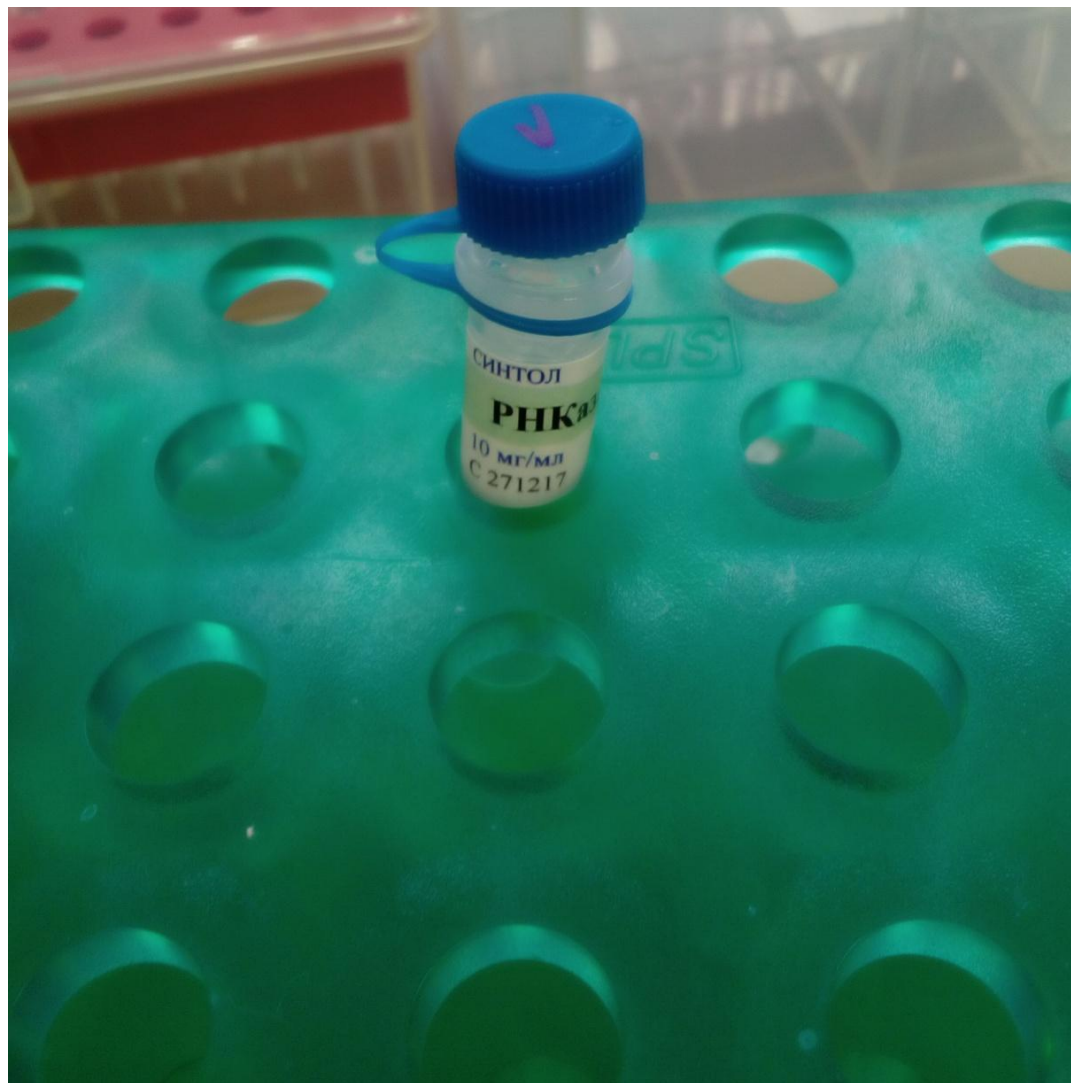
Добавить реагент

**Сбросить
наконечник
(«ТИП»)**

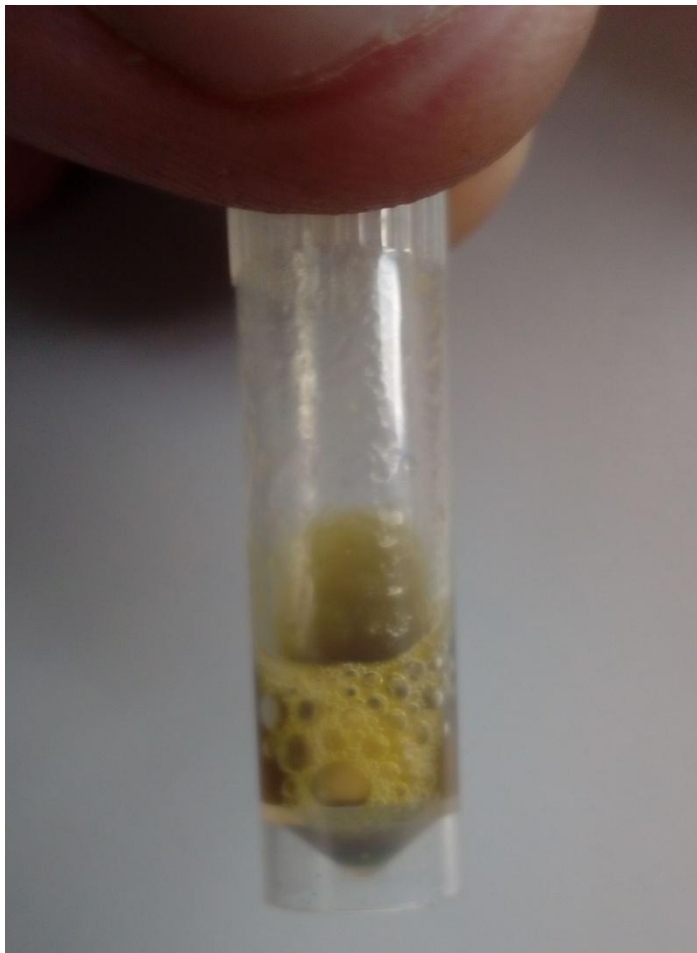
**Закрыть пробирки,
баночки с
реактивами**



Удаление РНК



**Трясем через
каждые 20
МИН**



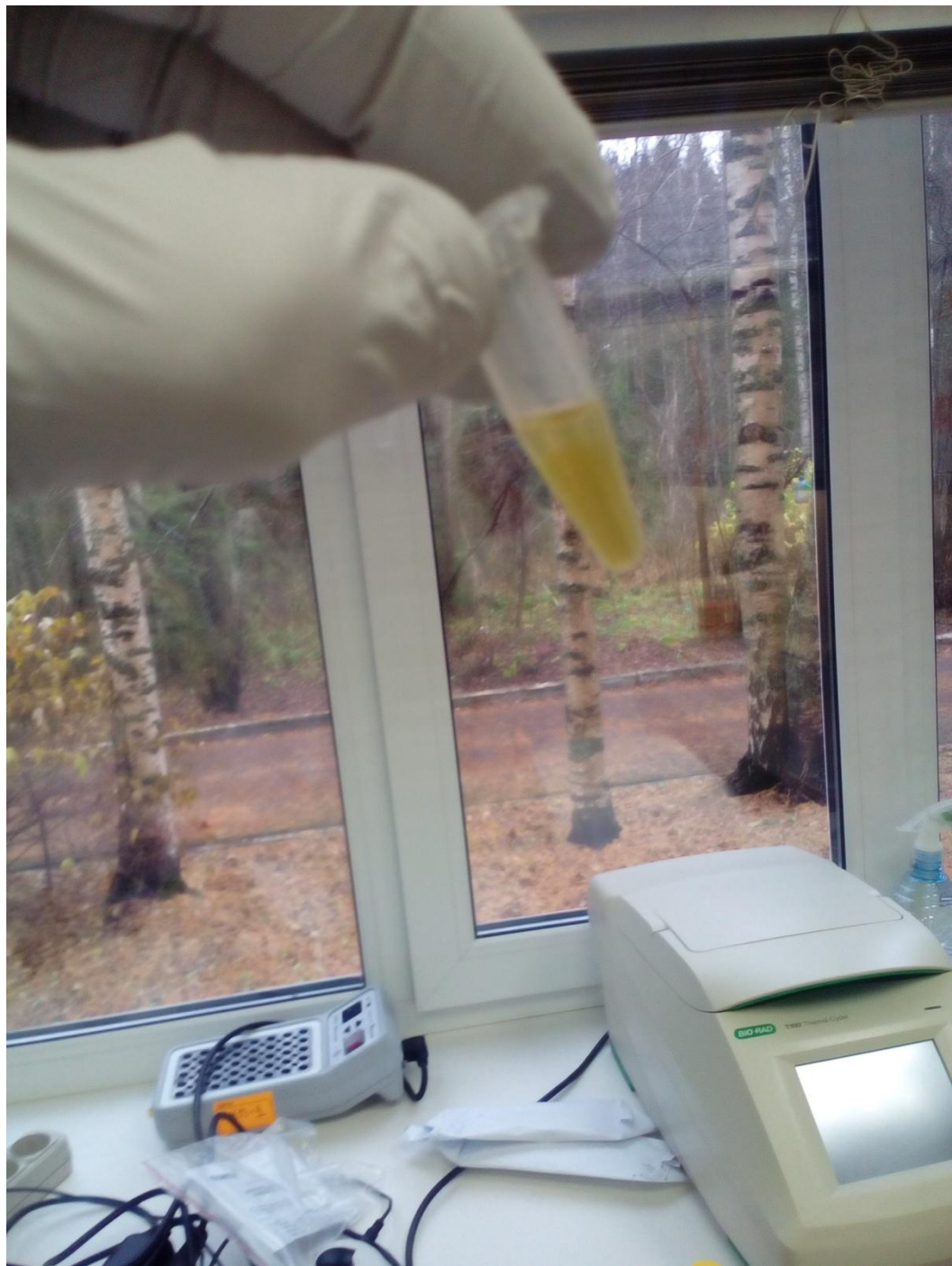
3. Осаждение белков

- 3.1. К лизату добавить 100 мкл *Осаждающего раствора 1 (№3)*.
Перемешать содержимое пробирок на вортексе 20 секунд.
- 3.2. Центрифугировать смесь при 13 000 об. в течение 5 мин. На дне пробирки должен образоваться плотный осадок.
Если осадок недостаточно плотный, охладить пробирки во льду 10 мин и снова центрифугировать.



4. Осаждение ДНК

- 4.1. Супернатант, содержащий ДНК, перенести в полном объеме не задевая осадок в чистые 1.5 мл пробирки.
- 4.2. Добавить **300 мкл** *Осаждающего раствора 2 (№4)* и перемешать переворачиванием (8–10 раз) до появления видимого осадка ДНК.
- 4.3. Центрифугировать смесь при 13 000 об/мин. 5 мин. Осторожно слить супернатант и промокнуть пробирки на фильтровальной бумаге. Подсушить пробирки в термостате 10-15 мин при 37 °С до полного высыхания.







5. Промывка и растворение ДНК

- 5.1. Добавить 400 мкл *Промывочного раствора (№5)* и перемешать несколько раз переворачиванием.
- 5.2. Центрифугировать 2 мин при 13 000 об/мин. Осторожно удалить супернатант и промокнуть пробирки на фильтровальной бумаге.
- 5.3. Открытые пробирки подсушить на воздухе или в термостате при 37°C 10-15мин до полного высыхания.
- 5.4. Добавить к осадку 30-50 мкл *Элюирующего раствора (№6)*. Перемешать и прогреть при 65°C 5 мин до растворения ДНК.
- 5.5. Полученный раствор ДНК хранить при -20 °C.
Допустимо кратковременное хранение раствора ДНК при +4 °C.



Хранение ДНК при температуре минус 20 °С