



УДК 54.052: 577.1

Оптимизация изоляции ДНК из тканей печени крысы с использованием техники, основанной на сорбции нуклеиновых кислот

Башмаков В.Ю., Солодских С.А., Паневина А.В.,
Шматкова М.Л., Попов В.Н.

Воронежский государственный университет, Воронеж

Поступила в редакцию 6.04.2012 г.

Аннотация

Для большого числа молекулярно-биологических работ, а также для изучения физико-химических свойств нуклеиновых кислот, их химических модификаций важную роль играет способ получения нуклеиновой кислоты, степень чистоты препарата и количество вещества на выходе. В настоящее время помимо традиционной фенол-хлороформной экстракции широко используются и другие способы получения нуклеиновых кислот для анализа – магнитные частицы, хроматографические методы, сорбция кислот на различных носителях. Для наибольшей репрезентативности и достоверности научных результатов необходимо получить исходный материал для работы – нуклеиновую кислоту – в максимально интактном виде. Для этого выбирается наиболее оптимальная методика. В настоящей статье рассматривается эффективность получения препарата ДНК с применением различных подходов – фенол-хлороформной экстракции и выделения на кремниевом сорбенте.

Ключевые слова: ДНК, фенол-хлороформная экстракция, кремниевый сорбент, электрофорез

Purity of nucleic acids, the way they were obtained and nucleic acid yield are crucial for many molecular biology techniques, studying the physicochemical properties of nucleic acids and chemical modification. Though phenol-chlorophorm-based extraction of DNA remains traditional, other approaches are also widely-used, such as magnetic particles, chromatography or sorbents usage. The appliance of two different techniques (phenol-chlorophorm extraction and sorbent-based isolation) is observed in the present article.

Keywords: DNA, phenol-chlorophorm extraction, silica sorbent, electrophoresis

Введение

Выделение ДНК является рутинной процедурой в молекулярно-биологических исследованиях как фундаментального, так и прикладного характера. В зависимости от объекта исследования, цели работы применяются различные методы. Существует несколько подходов для выделения ДНК [1], множество коммерческих наборов реактивов для выделения доступны. Оптимизация процесса выделения ДНК является важным этапом многих работ и предметом для изучения. В литературе можно найти оптимизированные протоколы выделения для различных

объектов: тканей насекомых [2], растений [3], плазмы крови человека [4]. Цель настоящей работы – получение препарата ДНК из печени крысы, обладающий максимальной степенью целостности и свободного от присутствия РНК и фрагментов низкомолекулярной деградировавшей ДНК.

Теоретическая часть

Оптимизация протокола или способа выделения ДНК особенно важно при работе с так называемыми модельными объектами. Метод фенол-хлороформной экстракции применительно к РНК был предложен более 20 лет назад [5]. Метод основан на разделении фаз кислого раствора, содержащего фенол, хлороформ, ацетат натрия. ДНК отделяется от РНК в водной фазе раствора после центрифугирования. Для выделения ДНК используется тот же подход в некоторых модификациях. Другие распространенные методы (выделение на магнитных частицах, сорбция ДНК) основаны на специфическом и селективном сродстве нуклеиновой кислоты к какому-либо носителю. Метод экстракции оценивается по его эффективности, стоимости и возможным побочным эффектам, например, деградации ДНК в процессе экстракции. ДНК может быть выделена из любого биологического материала: из крови и других жидкостей организма, различных типов тканей и клеток, содержащих ядра. У человека ДНК чаще всего выделяют из лейкоцитов крови. Процесс выделения ДНК состоит из нескольких этапов: быстрый лизис клеток, удаление фрагментов клеточных органелл и мембран, ферментативное разрушение и экстрагирование белков, осаждение молекул ДНК в этаноле с последующим их растворением в буферном растворе. Оценку качества выделенной ДНК проводят на основании измерения оптической плотности раствора ДНК в области белкового и нуклеинового спектров поглощения. Идеальная методика выделения должна быть оптимизирована по следующим параметрам: выход ДНК, количество деградированной в процессе выделения ДНК, возможность для использования множества образцов для анализа.

Нами были использованы три подхода для выделения и последующей оценки качества геномной ДНК из тканей печени крысы *Rattus norvegicus L.*, модельного биологического объекта. В работе использовали стандартный метод фенол-хлороформной экстракции, коммерческий набор фирмы «Fermentas» (Латвия), основанный на разделении фаз раствора в присутствии избытка хлороформа, и набор S-Сорб фирмы «Синтол» (Россия), основанный на сорбции ДНК кремниевым носителем.

Обсуждение результатов

В качестве объекта исследования использовали гомогенат тканей печени беспородной лабораторной крысы *Rattus norvegicus L.* для последующей экстракции ДНК. Большинство реактивов для изоляции были доступны в составе коммерческих наборов. Фенол, хлороформ для исследований были предоставлены фирмой «Вектон» (Воронеж). Оборудование, использованное в работе: автоматические дозаторы, микроцентрифуга Eppendorf 5418, вортекс FVL-2400N (Biosan).

Выделение ДНК фенольным методом проводилась согласно стандартному протоколу [6], изоляция другими методами осуществлялась в соответствии с протоколами фирмы-изготовителя с небольшими модификациями. Качество

выделенной ДНК оценивали с помощью электрофоретического разделения препарата в 2% агарозном геле с бромистым этидием и последующей визуализации на трансиллюминаторе.

Эффективность того или иного метода оценивали по электрофореграмме соответствующего препарата. Наличие нуклеиновой кислоты определяли по свечению в ультрафиолетовой области спектра комплекса ДНК и интеркалирующим красителем – бромистым этидием. Показателем чистоты препарата, а следовательно, и эффективности применяемого подхода, служит отсутствие примесей низкомолекулярных фрагментов нуклеиновых кислот, видимых на электрофореграмме и возникающих в результате деградации геномной ДНК в процессе выделения, а также примесей РНК. Электрофореграмма препарата ДНК, полученного традиционным методом хлороформной экстракции, представлена на рис. 1.

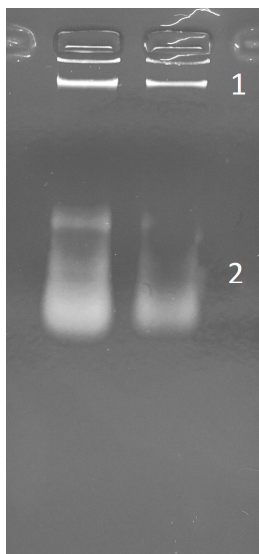


Рис. 1. Электрофореграмма ДНК из печени крысы, выделенной методом фенол-хлороформной экстракции: 1 – ДНК; 2 – фрагменты деградировавших нуклеиновых кислот

Как видно из рис.1, качество и количество ДНК в данном случае приемлемы, о чем свидетельствует четкая полоса на электрофореграмме, обладающая сравнительно высокой интенсивностью свечения. Однако часть ДНК деградировала в процессе выделения и проявилась на электрофореграмме в виде менее ярких, но заметных следов, соответствующих фрагментам нуклеиновых кислот разной длины. Следовательно, потенциальный выход вещества, пригодного для дальнейшего исследования, ниже ожидаемого уровня ввиду деградации. Такой препарат становится непригодным для некоторых видов работ – мечения, секвенирования и т.д.

Основанный на сходном принципе коммерческий набор фирмы «Fermentas» также позволил изолировать ДНК из печени крысы. Электрофореграмма представлена на рис. 2.

Применение данного метода так же выявило наличие примесей неспецифических продуктов деградации нуклеиновых кислот, кроме того электрофорез показал наличие в препарате фракции РНК («2» на рис. 2). РНК обычно проявляется на электрофореграмме в виде двух полос, соответствующим рибосомальной РНК, что видно на рис. 2. Непродолжительное хранение препарата в условиях повышенной для ДНК температуры (+4° С) позволило избавиться от

примесей, но в то же время значительно снизило содержание ДНК в препарате, о чем свидетельствует более слабое свечение полосы ДНК («б» на рис. 2) по отношению к первоначальному состоянию («а» на рис. 2).

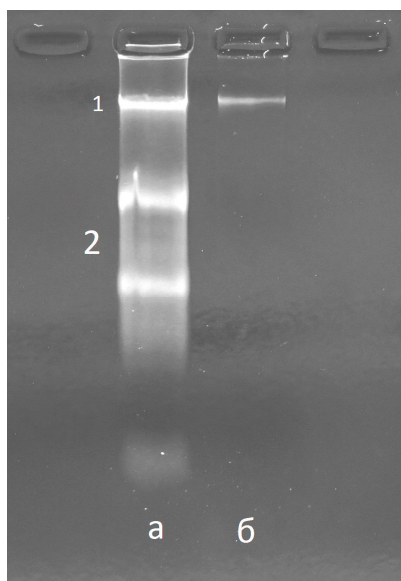


Рис. 2. Электрофореграмма ДНК из печени крысы, выделенной с помощью набора фирмы «Fermentas»: 1 – ДНК; 2 – фрагменты деградировавших нуклеиновых кислот и РНК; а, б – пояснения в тексте

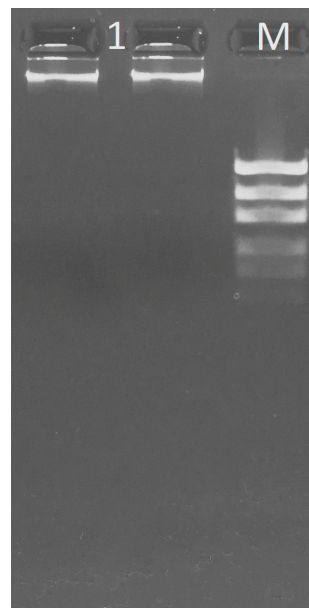


Рис. 3. Электрофореграмма ДНК из печени крысы, выделенной с использованием кремниевого сорбента: 1 – ДНК; М – линейка масс нуклеиновых кислот

Самым эффективным оказалось использование кремниевого сорбента для изоляции ДНК. Очевидно, подобное преимущество этому подходу дает селективное связывание ДНК с сорбентом, что делает его более специфическим. Электрофорез не показал наличие примесей фрагментов деградации ДНК или присутствие РНК (рис. 3).

Препарат геномной высокомолекулярной ДНК, выделенный с сорбентом, является универсальным по дальнейшему использованию: может применяться как для рестрикционного анализа, так для секвенирования и т.д. Линейка масс («М» на рис. 3) показывает соответствие выделенной ДНК размерам геномной – более 1000 п.н.

Заключение

Существенным моментом при выборе методики получения ДНК является время анализа и степень очистки. Классический метод выделения ДНК был описан в 1952 году и используется в настоящее время без значительных изменений [7]. В настоящее время помимо традиционной экстракции широко используются и другие способы получения нуклеиновых кислот для анализа – магнитные частицы, хроматографические методы, сорбция кислот на различных носителях. Все методики имеют как достоинства так и недостатки, применение того или иного подхода может адекватным для одного объекта и в то же время совершенно неприемлемым для другого. Нами показано, что некоторые наиболее распространенные методики

изоляции ДНК применимы для изучения генетического аппарата клеток печени крысы. Оптимизация процесса выделения ДНК является важным этапом многих работ и предметом для изучения. Цель настоящей работы – получение препарата ДНК из печени крысы, обладающего максимальной степенью целостности и свободного от присутствия РНК и фрагментов низкомолекулярной деградировавшей ДНК. Наиболее репрезентативны и универсальны оказались результаты, полученные с применением метода изоляции, основанного на сорбции ДНК. Из электрофореграмм, представленных в работе (рис. 1-3) видно, что именно эти препараты характеризовались целостностью, отсутствием примесей РНК и продуктов деградации. Препараты ДНК, изолированной с помощью кремниевого сорбента, универсальны в применении – могут использоваться как для базовых молекулярно-биологических анализов, так и для более требовательного к качеству ДНК секвенирования.

Список литературы

1. Milligan BG. Total DNA isolation // Oxford University Press. 1998. pp. 29–64.
2. Hong Chen, Murugesan Rangasamy, Sek Yee Tan, Haichuan Wang, B. D. Siegfried. Evaluation of Five Methods for Total DNA Extraction from Western Corn Rootworm Beetles // PLoS One. 2010. 5(8).
3. Lutz K, Wenqin W., Zdepski A., Michael T. Isolation and analysis of high quality nuclear DNA with reduced organellar DNA for plant genome sequencing and resequencing // BMC Biotechnol. 2011; 11: 54.
4. Bravo D., Clari M., Costa E., Muñoz-Cobo B., Solano C., Remigia M.J., Navarro D. Comparative Evaluation of Three Automated Systems for DNA Extraction in Conjunction with Three Commercially Available Real-Time PCR Assays for Quantitation of Plasma Cytomegalovirus DNAemia in Allogeneic Stem Cell Transplant Recipients // J Clin Microbiol. 2011. 49(8): 2899–2904.
5. Chomczynski P., Sacchi N.. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction: twenty-something years on // Nature protocols. 2006. vol.1. no.2.
6. Rogers S.O., Bendich A. J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues // Plant Molecular Biology. 1985. Vol. 5. 69-76.
7. Kay E., Simmons N., Alexander L. An Improved Preparation of Sodium Desoxyribonucleate // J. Am. Chem. Soc. 1952. Vol. 74 (7). 1724–1726.

Башмаков Виктор Юрьевич – аспирант кафедры генетики, цитологии и биоинженерии биолого-почвенного факультета Воронежского государственного университета, Воронеж, конт. тел. 2208876

Солодских Сергей Алексеевич – студент 3 курса кафедры генетики, цитологии и биоинженерии биолого-почвенного факультета Воронежского государственного университета, Воронеж

Паневина Анна Викторовна – студ.4 курса кафедры генетики, цитологии и биоинженерии биолого-почвенного факультета Воронежского государственного университета, Воронеж

Bashmakov Victor Yu. – postgraduate at Genetics, Cytology and Bioengineering Dep., Faculty of Biology and Soil Sciences, Voronezh State University, Voronezh, email: vito-mail2012@yandex.ru

Solodskikh Sergey A. – 3rd year student at Genetics, Cytology and Bioengineering Dep., Faculty of Biology and Soil Sciences, Voronezh State University, Voronezh

Panyovina Anna V. – 4th year student at Genetics, Cytology and Bioengineering Dep., Faculty of Biology and Soil Sciences, Voronezh State University, Voronezh

Шматкова Мария Леонидовна – студентка 4 курса кафедры генетики, цитологии и биоинженерии биолого-почвенного факультета Воронежского государственного университета, Воронеж

Попов Василий Николаевич – профессор, д.б.н., заведующий кафедрой генетики, цитологии и биоинженерии биолого-почвенного факультета Воронежского государственного университета, Воронеж

Shmatkova Maria L. – 4th year student at Genetics, Cytology and Bioengineering Dep., Faculty of Biology and Soil Sciences, Voronezh State University, Voronezh

Popov Vasily N. – professor, Dr. Biol., Head of Genetics, Cytology and Bioengineering Dep., Faculty of Biology and Soil Sciences, Voronezh State University, Voronezh

-