

## Анализ методов выделения ДНК из биологического материала

*Брыкова Анастасия Леонидовна*

*Приамурский государственный университет им. Шолом-Алейхема*

*студент*

### Аннотация

В статье рассматриваются наиболее известные методы выделения ДНК. Подробно описан солевой метод выделения генетического материала для дальнейшего анализа методом полимеразной цепной реакции. Данная статья содержит апробированную методику выделения ДНК из мягких тканей животных.

**Ключевые слова:** ДНК, методы выделения ДНК, солевой метод.

## Analysis of DNA extraction methods from biological material

*Brykova Anastasia Leonidovna*

*Sholom-Aleichem Priamursky State University*

*Student*

### Abstract

The most famous DNA extraction methods are viewed in the article. The salt method for the isolation of genetic material is described in detail. The isolated DNA is used in the subsequent analysis by the method of polymerase chain reaction. This article contains an approve methods extraction DNA from soft tissue of animals.

**Keywords:** DNA, DNA extraction methods, salt method.

### Введение

ДНК принадлежит чрезвычайно важная функция - это хранение наследственной информации, которая заключена в последовательности нуклеотидов, она необходима для поддержания и воспроизведения всего живого на планете. На сегодняшний день ведется активное исследование ДНК как в России, так и во всем мире. Анализ ДНК нашел широкое применение в криминалистике, медицине, генной инженерии, в исследовании биоразнообразия, в экологических и эволюционных исследованиях. Важным этапом, предшествующим диагностике проб, является выделение ДНК из тканей. За последние десятилетия разработано множество методов очищения нуклеиновых кислот, отличающихся по длительности процесса выделения, качеству и количеству полученной ДНК, а также стоимости реактивов и оборудования. Кроме того, выбор метода зависит от исследуемого объекта, типа ткани, с которой необходимо работать, ведь генетический материал можно выделить мягких тканей, из

кости, луковиц волос, и т.д., как из свежего, так из музейного материала (если сохранилась ДНК). Далее рассмотрим основные этапы выделения ДНК, а также приведем несколько наиболее распространенных методик получения генетического материала из тканей.

### 1. Основные этапы выделения ДНК из тканей

На начальном этапе необходимо разрушить ткани и клетки, для того чтобы выделить ДНК и очистить ее от белков, углеводов и других клеточных компонентов. При этом важно защитить ДНК от действия нуклеаз и максимально сохранить ее целостность, поскольку длинные линейные молекулы ДНК при их изоляции из клетки неизбежно фрагментируются.

Методы выделения ДНК обычно включают следующие этапы:

- 1) лизис клеток;
- 2) ферментативное разрушение белков протеиназами и/или депротеинизация клеточного лизата с помощью фенола и хлороформа;
- 3) центрифугирование для удаления денатурированных белков и фрагментов клеток.

После этого, ДНК осаждают из раствора этанолом и после центрифугирования растворяют осадок в буферном растворе. Вместе с ДНК частично выделяется и РНК, от которой в некоторых случаях избавляются с помощью фермента РНКазы.

Для оценки качества и количества выделенной ДНК применяется процедура электрофореза ДНК в агарозном геле путем визуального сравнения с образцами известной концентрации (например, ДНК фага  $\lambda$ ) [1].

### 2. Выделение ДНК при помощи магнитных частиц

Данный метод заключается в том, что в исследуемый образец добавляются магнитные частицы, представляющие собой микроскопические шарики, и специальное лизирующее средство. Шарики связывают выделенную ДНК, а в процессе очищения происходит вымывание оставшихся клеточных элементов. Завершающим шагом становится элюирование молекулы низко солевым буфером. Из недостатков можно говорить лишь о стоимости исследования, она сравнительно высока по отношению к другим методам. Из плюсов определяют:

- возможность выделять большое количество нуклидов за счёт большого объёма сорбента;
- в момент выделения минимизированы потери;
- малый риск перекрёстной контаминации, так как почти все нуклеиновые молекулы связываются сорбентом;
- масштабность методики;
- высокое качество продукта на выходе [4].

### 3. Экстракция с использованием бумажных фильтров

Для выделения используют целлюлозный фильтр, пропитанный реагентами, которые связывают нуклеиновые кислоты, денатурируя при этом белки. При этом ДНК надежно защищена фильтром от ультрафиолета и нуклеаз. Преимущества метода заключается в следующем:

- безопасность в обращении с материалом;
- быстрое выделение ДНК;
- отсутствие посторонних компонентов в выделенном материале;
- возможность длительного хранения полученного образца при комнатной температуре;

Главный недостаток – возможность применения только на жидких образцах, а также высокая цена материалов для выделения ДНК данным способом [5].

#### 4. Экстракция ионообменной смолой

Метод достаточно прост. Основная процедура выделения включает в себя инкубацию образца ткани с протеиназой К и ионообменной смолой. К исследуемому материалу в пробирку добавляется смола, после чего смесь выдерживается в течение получаса при определенной температуре. После необходимо центрифугирование. Процедура проста и не требует больших временных затрат, кроме того, подходит для работы с практически любым материалом (бактерии, кровь, ткани, луковицы волос). В современной криминалистике наиболее популярно использование ионообменной смолы Chelex 100, так как конечным результатом является получение незагрязненных и неповрежденных образцов ДНК. Недостаток данного метода заключается в сравнительно высокой стоимости реактивов и оборудования [2].

#### 5. Солевой метод выделения ДНК

Наиболее подробно рассмотрим солевой метод выделения ДНК, так как он достаточно прост и позволяет за короткое время получить материал, подходящий для дальнейших исследований. Главное преимущество данного метода – сравнительно небольшая себестоимость (в отличие от метода магнитных частиц и готовых коммерческих наборов для экстракции ДНК). Кроме того, метод универсален для различных типов тканей, он позволяет работать с мышечной, хрящевой, а также тканями печени.

Для экстракции ДНК солевым методом необходимы следующие *материалы и оборудование*: образцы тканей, микроцентрифуга, микропипетки-дозаторы с одноразовыми наконечниками, термостатируемая качалка-шейкер, пробирки объемом 1,5 и 2 мл, пинцеты и ножницы.

*Растворы*: гомогенизирующий буфер, SDS 10% (sodium dodecyl sulfate – распространенное поверхностно-активное вещество), протеиназа К, 6М NaCl, изопропиловый спирт, 3М  $C_2H_3NaO_2$  (трехмолярный ацетат натрия), этиловый спирт 70%, бидистиллированная вода.

*Протокол выделения ДНК* включает в себя следующие этапы:

1. Подготовка рабочего места (обработка стола спиртом, термообработка ножниц и пинцетов над спиртовкой, разморозка тканей и необходимых реактивов, нанесение маркировки на пробирки V 1,5 и 2 мл).

2. В пробирки объемом 1,5 мл добавить:

а) 400 мкл гомогенизирующего буфера;

б) образец ткани размером 2x2x2 (измельчить ножницами прямо в пробирке);

в) 80 мкл SDS 10%;

г) 8 мкл протеиназы К.

3. Инкубировать пробирки с раствором на термошейкере в течение 17 часов при температуре 50°C, со скоростью 300 оборотов в минуту. Этап можно значительно сократить если сильно измельчить ткани, тогда гомогенизация пройдет быстрее.

4. На второй день в каждую пробирку с образцами добавить 300 мкл 6М NaCl, встряхнуть содержимое (30 секунд) и поставить в микроцентрифугу на 30 минут, выставить скорость вращения 13400 об/мин. В результате центрифугирования на дне пробирки осядут не нужные нам компоненты.

5. Далее необходимо собрать супернатант (не захватывая осадок на дне) и переместить его в пробирки объемом 2 мкл (каждый образец чистым наконечником). Можно центрифугировать пробирки с осадком в течение 5 минут, чтобы собрать остатки раствора.

6. Добавить в пробирки с супернатантом 788 мкл изопропанола (объем равен ранее добавленным растворам), после добавить 80 мкл трехмолярного ацетата натрия, поставить на час в морозильную камеру.

7. Далее следует центрифугирование на протяжении 20 минут, после чего ДНК осядет на стенках пробирок. Теперь можно аккуратно слить супернатант.

8. Для промывки ДНК добавить в 500 мкл 70% этилового спирта, открутить пробирки в микроцентрифуге в течение 5 минут. После осторожно слить спирт и сушить пробирки около 10 минут, перевернув их входным отверстием на салфетку.

9. Добавить 50 мкл бидистиллированной воды, убрать полученные образцы в морозильную камеру [3].

Данный метод позволяет получить качественные образцы ДНК без примесей. В этом можно убедиться с помощью гель-электрофореза, позволяющего визуально оценить концентрацию и качество экстрагированного материала. ДНК полученную солевым методом можно длительное время хранить в замороженном виде, кроме перечисленных достоинств нужно отметить сравнительно низкую стоимость реактивов. Выбранная методика была использована при исследовании соболя (*Martes zibellina*). Подробное описание применения рассмотрено в следующих статьях.

## **Библиографический список**

1. Великов В.А Молекулярная биология. Саратов: Саратовский источник, 2013. 84 с.
2. Корниенко И.В., Водолажский Д.И., Вейко В.П., Щербаков В.В., Иванов П.Л. Подготовка биологического материала для молекулярно-

- генетических идентификационных исследований при массовом поступлении неопознанных тел. Ростиздат, 2001. 256 с.
3. Aljanabi S.M., Martinez I. Universal and Rapid Salt-Extraction of High Quality Genomic DNA for PCR-Based Techniques // *Nucleic Acids Research*, 1997, №22, С. 4692–4693.
  4. Методы выделения ДНК // Test DNK Lab URL: <https://testdnk.pro/informacia/metody-vydeleniya-dnk.html> (дата обращения: 15.01.2019).
  5. Пробоподготовка. Методы выделения ДНК/РНК. // DOCPLAYER URL: <https://docplayer.ru/429091-Probopodgotovka-metody-vydeleniya-dnk-rnk-kulmamabetova-g.html> (дата обращения: 15.01.2019).