Лекція 1 **ВИДІЛЕННЯ ДНК З ПРИРОДНИХ ОБ’ЄКТІВ**

Процедура виділення ДНК з клітин і тканин часто є початковим (основним) етапом у більшості молекулярно-біологічних досліджень.

У зв'язку з тим, що існують різноманітні методи виділення та очищення нуклеїнових кислот, вибір найбільш підходящої методики базується на таких передумовах:

• цільова нуклеїнова кислота;

• джерело нуклеїнових кислот і первинний матеріал – організм (рослинні та тваринні тканини, мікроорганізми), листя, насіння, продукти переробки, фізіологічні рідини і т.ін.);

• очікувані результати (вихід, чистота, час, потрібний ступінь очищення та ін.);

• мета подальшого використання нуклеїнових кислот (ПЛР, клонування, введення мітки, блот-гібридизація, ПЛР у реальному часі, синтез кДНК і т.ін.).

Від ДНК безпосередньо або через білки-ферменти залежать усі біосинтези і катаболізм клітини. Клітину необхідно зруйнувати тим або іншим способом, а хромосомну ДНК очистити від інших клітинних компонентів. Передусім, треба відокремити ДНК від білків, що входять до складу нуклеопротеїдних комплексів хроматину. При цьому важливо захистити ДНК від дії нуклеаз і максимально зберегти її цілісність, оскільки довгі лінійні молекули ДНК при їх ізоляції з клітини неминуче фрагментуються.

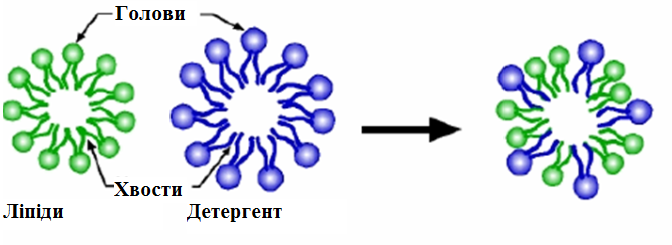
Методи виділення ДНК зазвичай включають наступні етапи: 1) лізис клітин (чи руйнування фізичним, механічним способом); 2) ферментативне руйнування білків протеїназами і/або депротеїнізацію клітинного лізату за допомогою фенолу і хлороформу; 3) Очистка від низько- та високомолекулярних домішок (хімічна, центрифугування для видалення денатурованих білків і фрагментів клітинних органел). 4) Осадження. ДНК осаджується з розчину етанолом і після центрифугування розчиняють осад у буферному розчині. Разом з ДНК частково виділяється і РНК, від якої позбавляються за допомогою ферменту РНКази.

Для **лізису** клітин і денатурації білків часто використовується детергенти (додецилсульфат натрію, бромистий цетилтриметиламонію, меркаптоетанол, тритон Х-100) і хаотропный агент гуанидинізотіоціанат.

Всі біологічні мембрани мають в цілому однакову структуру, що включає ліпідні і білкові молекули, які взаємодіють між собою за рахунок нековалентних зв'язків.

Ліпідні молекули формують подвійний шар , в якому локалізовані білкові молекули. Ліпідні молекули складаються з гідрофільного кінця («голова») і гідрофобного кінця («хвіст»).

Детергент зазвичай міститься в буфері для екстракції. У зв'язку з тим, що хімічний склад ліпідів і детергенту подібний, компоненти детергенту в буфері для екстракції можуть здійснювати «захоплення» ліпідів, що утворюють мембрани клітин і ядер.



Класичний катіонний детергент, використовуваний при екстракції ДНК, - **цетилтриметил бромід амонія (CTAB)**, який додається в екстрагуючий буфер. СТАВ лізирує клітинну мембрану, ефективно руйнує ДНК-білкові комплекси. При певній концентрації солі (NaCl) CTAB утворює нерозчинний комплекс з нуклеїновими кислотами.

Аніонні детергенти, наприклад **додецилсульфат натрію (SDS)**, при значеннях рН нижче ізоелектричної точки білку утворює з білками нерозчинні осади. Додецилсульфат натрію і **меркаптоетанол** осаджують білки і полісахариди як нерозчинний комплекс. Меркаптоетанол руйнує дисульфідні містки, у тому числі і у білках, з порушенням їх третинної і четвертинної структури і діє як біологічний антиоксидант, інгибіруя окислювальні процеси, які безпосередньо або побічно ушкоджують ДНК. Оскільки наявність дисульфідних мостиків підтримує стабільність нуклеаз, меркаптоетанол елімінує активність ферментів, що звільняються при лізисі клітин. Рідше використовуються неіонні детергенти, такі як **Тритон X - 100**, але оскільки вони "м'якші", білки можуть залишатися інтактними.

Присутні у буфері для екстракції **хаотропні** агенти, такі як солі, денатурують макромолекули, порушуючи водневі зв'язки, гідрофобні взаємодії і сили Ван-дер-Ваальса. Високі концентрації солей осаджують полісахариди, які інакше можуть утворювати з ДНК желеподібний комплекс.

В присутності у буфері екстракції **етилендиамінтетраоцетової кислоти (EDТА)** - хелатуючого агента, що зв'язує іони металів (Mg2+, Ca2+, Fe3+ та ін.), відбувається дезактивація металзалежних ферментів, присутніх в екстрактах. Найбільш важливим є те, що EDTA зв'язує магній, що є кофактором ферменту ДНКази.

**Виділення ДНК з бактерій**

Виділення загальної або тотальної ДНК з клітин бактерій з використанням додецилсульфата натрію, протеіназ і фенолу (Dhaese et al., 1979) є досить розповсюдженим підходом. Метод простий і надійний, існує у ряді модифікацій, як і багато інших методів.

Разом з хромосомною ДНК виділяється також плазмідна і фагова ДНК при їх наявності в клітині, а також РНК, від якої нескладно позбавитися.

Плазматична мембрана бактерійної клітини в цьому методі руйнується під дією детергента додецилсульфата натрію (SDS, sodium dodecyl sulfate) - одного з самих розповсюджених поверхнево-активних речовин. Цілісність пептидогліканового шару, так званого муреїнового мішка, при цьому теж порушується. Шляхом обробки бактерійного лізату фенолом, який денатурує протеїни, але не діє на нуклеїнові кислоти, видаляють усі білки, у тому числі білки нуклеоїда. Інші органічні сполуки клітини і низькомолекулярні речовини втрачаються при висадженні ДНК етанолом, оскільки залишаються в розчині. Отриманий в результаті центрифугування зразка осад нуклеїнових кислот (ДНК і РНК), розчиняють в спеціальному буфері для зберігання ДНК - буфері TE. Хелатуючий агент (ЕДТА), що входить до його складу, запобігає дії на ДНК клітинних нуклеаз, оскільки зв'язує необхідні для їх роботи катіони Mg 2+.

**Виділення ДНК з лейкоцитів крові**

Ізоляція загальної ДНК з тваринної клітини не представляє особливої складності, оскільки плазмалема, ядерна і мітохондріальна мембрани "розчиняються" у присутності аніонного детергента додецилсульфата натрію (SDS), а складної клітинної стінки у тварин в порівнянні з рослинами немає. Вивільнити ДНК з ДНК-білкового комплексу можна за допомогою протеїназ або хаотропних солей.

Для цієї ж мети можна провести як і у випадку з бактеріями фенольну екстракцію ДНК. Інші речовини при подальшому осадженні ДНК спиртом залишаться в розчині, і позбавитися від них нескладно.

ДНК можна виділити з будь-яких тканин, клітини яких містять ядра, але кількісний вихід з різних тканин може бути різним. Досить часто для виділення ДНК використовують кров. Лейкоцити крові, на відміну від зрілих еритроцитів, містять ядра. Загальною ДНК, виділеною з 100 мкл цільної крові вистачає для проведення декількох рестрикцій, ПЦР і секвенування. Мітохондріальна ДНК і РНК також є присутніми в отримуваному препараті. Часто для звільнення ДНК від білків використовується фенол. Під словом "фенол" біологи часто мають на увазі суміш водонасиченого фенолу з хлороформом 1: 1, а не кристалічна речовина. У суміші з хлороформом фенол працює ефективніше, а ізоаміловий спирт гасить піноутворення.

**Виділення ДНК з рослинних тканин**

Виділяти ДНК можна зі свіжих або заморожених (при - 70-80оС) рослинних зразків, з частин рослин, висишених в силікагелі, або з гербарних зразків. Не будь-який гербарій підходить для виділення ДНК. Кращі результати досягаються у разі віку гербарію не більше 30-40 років і за умови його правильної і швидкої сушки. Для виділення ДНК зазвичай використовують листя рослин, але у зв'язку з тим, що різні органи рослин можуть мати відмінності в хімічному складі, у тому числі в змісті вторинних метаболітів, необхідно підбирати орган рослини, з якої виділяється якісніша ДНК. При виборі частин рослини для виділення ДНК необхідно пам'ятати про те, що треба вибирати ділянки, не уражені грибковими і іншими захворюваннями, щоб уникнути забруднення проб сторонньою ДНК. Якщо ДНК із зразків тканини не може бути екстрагована в найближчі 48 ч, зразок має бути заморожений при температурі від - 20 до - 80 оС або підданий сушці. Повторення циклів заморожування- відтаювання не рекомендується.

При виділенні ДНК з тканин рослин важливим чинником є ефективне руйнування клітинних стінок. Багато методів, використовуваних для цього, призводять до сильної фрагментації ДНК (із-за гідродинамічних розривів в ланцюзі!). Часто доводиться знаходити компроміс між розміром ДНК і її кількісним виходом, адже молекули ДНК - найбільші полімерні біомакромолекули. Вивільнення високомолекулярної ДНК з клітин - це тільки частина завдання, оскільки рослинні екстракти містять великі кількості білків, полісахаридів, танінів і пігментів, які у ряді випадків дуже важко відокремити від ДНК.

Тканини рослин зазвичай руйнують механічним розтиранням у присутності детергентів, розчинювальних мембрани клітин, і хелатуючих агентів, що пригнічують дію клітинних нуклеаз за рахунок зв'язування двовалентних катіонів. Від білків ДНК-комплексу позбавляються фенольною депротеїнізацією зразка. Деякі методики для звільнення ДНК від білків хроматину передбачають використання протеїназ. Після депротеїнізації препарат всѐ щѐ сильно забруднений полісахаридами.

Якщо потрібно велику кількість чистої ДНК, то зразки очищають ультрацентрифугуванням в градієнті щільності хлористого цезію.

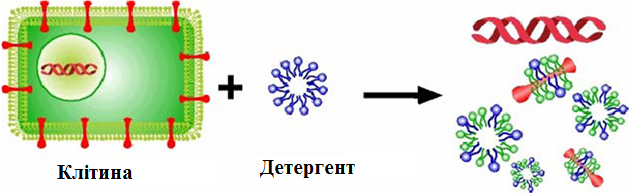
Поширені методи з використанням двох детергентів CTAB (бромистого цетилтриметиламонію) і SDS (sodium dodecyl sulfate). **Метод з використанням СTAB** (Rogers, Bendich, 1985) дозволяє отримувати препарати рослинної ДНК з чистотою, достатньою для ПЛР, рестрикційного і гібридизаційного аналізу. CTAB добре розчиняє мембрани клітин. Крім того, його застосування дозволяє розділити ДНК і полісахариди, оскільки вони відрізняються по розчинності у присутності цієї поверхнево-активної речовини. При високих концентраціях солей нуклеїнові кислоти утворюють стабільні, але в той же час розчинні комплекси з CTAB. При зниженні концентрації солі нижче 0,4М NaCl відбувається випадання в осад комплексів CTAB/нуклеїнова кислота, тоді як велика частина полісахаридів залишається в розчині. Осад знову розчиняють у високосольовому розчині 1М NaCl і висаджують ДНК спиртом.

Цей метод добре підходить для виділення і очищення ДНК з рослин і харчових продуктів рослинного походження; і особливо зручний для видалення полісахаридів і поліфенолів, які мають негативний вплив на чистоту ДНК, а відтак – на її якість. Виділення ДНК за методом ЦТАБ широко застосовується в молекулярній генетиці рослин. Розроблено кілька варіантів даної методики з метою адаптації її до широкого спектру вихідного матеріалу.

*Отже, Метод з використанням ЦТАБ включає в себе стадії лізису, очистки і осадження.*

**Лізис клітинної мембрани.** Першим етапом виділення ДНК є руйнування клітинних і ядерних стінок. Для цього гомогенізований зразок обробляють спочатку буфером для екстракції, що містить ЕДТА, Tris-HCI і ЦТАБ.

Під час взаємодії клітинних мембран з буфером для екстракції, що містить ЦТАБ, детергент захоплює ліпіди і білки, вивільняючи геномну ДНК. За певної концентрації солі (NaCl) детергент утворює нерозчинний комплекс з нуклеїновими кислотами. ЕДТА є хелатним агентом, який, поряд з іншими металами, здатний зв'язувати магній. У разі зв'язуванні магнію з ЕДТА знижується активність наявних ДНКаз. Буфер Tris-HCI надає розчину здатність підтримувати рН (у зв'язку з тим, що і низькі, і високі значення рН спричиняють ушкодження ДНК).



Рослини характеризуються накопиченням в певних органах великої кількості вторинних метаболітів, які мають негативний вплив на процедури ізолювання, а в подальшому можуть бути інгібіторами ПЛР-реакції. Поліфеноли, присутні у багатьох рослинах, при гомогенізації тканин вступають в реакції окислення, ковалентно зв'язуються з білками і нуклеїновими кислотами, осад ДНК стає коричневим, такі зразки ДНК непридатні для подальших досліджень. Зв'язати феноли і не допустити їх взаємодії з нуклеїновими кислотами можна за допомогою полімерів, що містяться в екстрагуючому буфері : **полівінілпіролідону(PVP) або поливинил- полівінілпіролідону(PVPP, модифікація PVP з поперечними зшиваннями)**.

**Виділення.** На цьому етапі необхідно відділити з водного розчину, в якому знаходиться ЦТАБ-комплекс нуклеїнових кислот, полісахариди, білки, фенольні сполуки та інші складові клітинного лізату.

За високої концентрації солі ДНК утворює зі ЦTAБ стабільні та розчинні комплекси. Домішки з комплексу нуклеїнових кислот не осідають і можуть бути видалені з водного розчину екстракцією хлороформом, який денатурує білки і полегшує розділення водної та органічної фаз. Якщо необхідно, для того, щоб повністю видалити домішки з водного шару, екстракцію хлороформом повторюють два або три рази. Щоб досягти кращого виходу нуклеїнових кислот, органічну фазу доцільно повторно екстрагувати водним розчином, а потім додати його до першого екстракту.

**Осадження.** За зниження концентрації солі (<0,4 М NaCl) комплекси ДНК-ЦТАБ випадають в осад, тоді як більша частина полісахаридів залишається в розчині. Після цього осад розчиняють у розчині NaCl (>1 М) та осаджують холодним спиртом (етиловий або ізопропіловий), бо полярні молекули ДНК нерозчинні в неполярному спирті. Обробка 70 % етанолом дає змогу провести додаткове очищення та відмивання нуклеїнових кислот від залишку солі.

Інша методика також передбачає використання детергентів, зокрема SDS, який також здійснює солюбілізацію біомембран і швидку денатурацію протеїнів (при цьому інактивуються нуклеази). Наприклад, метод Делапорта із співавт. (Dellaporta et al., 1985). Білки і полісахариди в рослинних екстрактах при 00 С утворюють комплекси з SDS і випадають в осад, а нуклеїнові кислоти залишаються в розчині. Високомолекулярна ДНК, очищена згодом від білків фенолом, осаджѐна спиртом і розчинѐна у відповідних буферах придатна для рестрикції і ПЛР.

У буфері ТЕ можна зберігати ДНК в холодильнику при +4 строком до декількох місяців. Для тривалішого зберігання ДНК в замороженому виді її розчиняють у бідистильованій або деіонізованій воді. Використати воду замість ТЕ-буфера зручно, оскільки не буде необхідності переосаджати ДНК перед постановкою реакцій, що вимагають іонів Mg2+, необхідних специфічним до ДНК ферментам. Проте заморожування-розморожування неминуче призводе до одно-/дво-ланцюгових розривів в ланцюзі ДНК. Краще всього з буфера ТЕ виключити ЕДТА і заморозити в ньому, оскільки бідистилят, приміром, має слабокислий показник pH, що для ДНК небажано. У глибокому заморожуванні при - 700С можна закласти ДНК на зберігання на роки.

**Твердофазні методи виділення ДНК**

Ряд сучасних методів передбачає сорбцію ДНК на гранулах силікагелю у присутності хаотропних речовин, центрифугування і подальшу елюцію ДНК з гранул в розчин. Деякі фірми продають набори реактивів для виділення ДНК з використанням магнітних часток, покритих **силікой** SiO2. Деякі комерційні набори передбачають сорбцію ДНК на мембранах або іонообмінних сорбентах.

В твердофазних методах виділення ДНК використовують такі процеси та принципи:

* водневі зв’язки з немодифікованою гідрофільною матрицею, зазвичай кварцем, в хаотропних умовах;
* іонообмін у водному розчині, зазвичай з використанням аніонообмінників;
* афінність;
* механізми виключення за розмірами.

Для виділення нуклеїнових кислот у твердофазних системах застосовують хроматографічні сепараційні колонки, носіями в яких є частинки на основі кварцу або скляних волокон, частинки з аніонообмінними властивостями, які адсорбують нуклеїнові кислоти. Ці носії застосовуються для виділення або очищення нуклеїнових кислот з висококонцентрованими розчинами хаотропних солей (йодид натрію, перхлорат натрію, гуанідин тіоціанату).

Твердофазні методи виділення поділяють на:

- виділення на склі або твердих частинках;

- методи на основі магнітного сепарування.

Методи виділення НК на склі або твердих частинках розглянемо на прикладі методу, запропонованого Boom. Цей метод включає в себе стадію лізису клітин сильним хаотропним агентом, який руйнує клітинні мембрани і інактивує внутрішньоклітинні нуклеази, і подальшу сорбцію нуклеїнової кислоти на носії. Нуклеїнова кислота оборотно зв’язується зі склом у присутності високої концентрації хаотропних солей (наприклад, гуанідин хлориду, гуанідин тіоціанату). У таких умовах зв'язування білків з матрицею не відбувається.

Хаотропні сполуки являють собою речовини, що порушують впорядковану структуру води і тим самим призводять мембрани в стан хаосу (наприклад, сечовина, йодид натрію). Таким чином, крім зв'язування, хаотропні агенти забезпечують руйнування клітинних мембран і лізис клітин з подальшим вивільненням нуклеїнової кислоти. Домішки відмиваються хаотропною сіллю, а хаотропна сіль – 80% етанолом. Очищена нуклеїнова кислота знімається зі скла буфером з низькою іонною силою.

На цей час багато комерційних фірм пропонують для виділення нуклеїнових кислот свої набори.

Використання магнітних твердих носіїв у біохімічних та молекулярно біологічних процесах має багато переваг порівняно з немагнітними сепараційними методами. Для зв’язування цільової речовини (у даному разі – ДНК) використовують магнітні носії з іммобілізованими афінними лігандами або лігандами з біополимерів, які збільшують афінність до потрібної нуклеїнової кислоти.

Зазвичай магніт прикладають до стінки посудини, яка містить зразок, щоб частинки зі вже зв’язаною цільовою речовиною агрегувалися біля стінки посудини або ж використовують стержні, які занурюються в розчин. Тоді незв’язані компоненти зразку, наприклад поліцукри, фенольні компоненти, які інгібують ДНК-полімеразу та ПЛР-реакцію, можна потім вилучити. Таким способом можна відокремлювати компоненти клітинного лізата.

Матеріалом для магнітних частинок можуть бути як синтетичні полімери або біополімери, так і неорганічні речовини на основі пористого скла або оксиду заліза з модифікованою поверхнею. Найкраще застосовувати для виділення суперпарамагнітні частинки, які не взаємодіють одна з одною за відсутності магнітного поля.

Для автоматичного виділення нуклеїнових кислот використовуються магнітні частинки зі скляним покриттям. Нуклеїнова кислота зв'язується зі скляною поверхнею, потім, вже зв'язана з частинками, вона проходить ті самі стадії екстракційного процесу, що і в методиці на склі.

Загальні ДНК і РНК не розділяються методом твердофазної сепарації за допомогою магнітних частинок, тому для виділення ДНК необхідно зруйнувати РНК ще на стадії сепарації ДНК. Для цього застосовують РНКазу або луг. Натомість, для виділення РНК доцільно викристосувати дезоксирибонуклеазу (ДНКазу).

**Спектрофотометрія препаратів ДНК і РНК**

Визначити концентрацію ДНК, а також міру її чистоти можна за допомогою спектрофотометра, що точніше і швидше. Для цього вимірюють оптичну щільність розчину ДНК при довжині хвилі 260 нм. Одна (кожна) оптична одиниця відповідає концентрації ДНК в 50 мкг/мл.

Спектрофотометрія (абсорбційна) - фізико-хімічний метод дослідження розчинів і твердих речовин, грунтований на вивченні спектрів поглинання в ультрафіолетовій(200-400 нм), видимій(400-760 нм) і інфрачервоній(>760 нм) областях спектра. Основна залежність, що вивчається в спектрофотометрії, - залежність інтенсивності поглинання світла, що падає, від довжини хвилі. У відповідності до закону Бугера-Ламберта-Бера оптична щільність розчину прямо пропорційна концентрації поглинаючої речовини. Нуклеїнові кислоти поглинають ультра-фіолетове (УФ) випромінювання в області 240-290 нм з максимумом при 260 нм. Хромофорами служать азотисті основи нуклеїнових кислот, особливо піримідинові. Піримідині поглинають УФ-світло приблизно в 10-20 разів інтенсивніше, ніж хромофоры білкових молекул - триптофан, тирозин і фенілаланін.

Для оцінки чистоти препарату ДНК, вільного від РНК, проводять виміри оптичної щільності розчину при довжинах хвиль 260, 280 і 235 нм, тобто на максимумах поглинання розчинів ДНК, білків і полісахаридів відповідно. Значення співвідношення А260/280 для чистої ДНК має бути більше, ніж 1,8, значення А260/235 - більше, ніж 2,2. Забруднення полісахаридами характерно головним чином для препаратів рослинної ДНК.

Досить часто кількісну і якісну оцінку препарату виділеної ДНК в першому наближенні дають при гель- електрофорезі, наступному, як правило, відразу за процедурою ви ділення. Для цього візуально порівнюють на сусідніх доріжках гелю інтенсивність світіння в ультрафіолеті отриманого зразка із зразком відомої концентрації ( електрофорез – наступна тема курсу!).