

Екстракція ДНК/РНК

Тренінг в рамках ПЗБЗ

Детекція *Francisella tularensis* методом ПЛР

м. Харків, 3 вересня 2018 р.

Крістіан Ланге, лікар ветеринарної медицини, PhD

Зміст



- Основи та загальні принципи
- Методи та компоненти
- Застереження та «підводні камені»

Основні принципи



- ДНК є унікальною та може бути використана для ідентифікації організму, якому належить
- ДНК може бути ампліфікована
- ДНК зазвичай не «вільна»
- Контамінанти (забруднюючі речовини) потрібно видалити
- Умови зберігання повинні бути враховані

ДНК та РНК



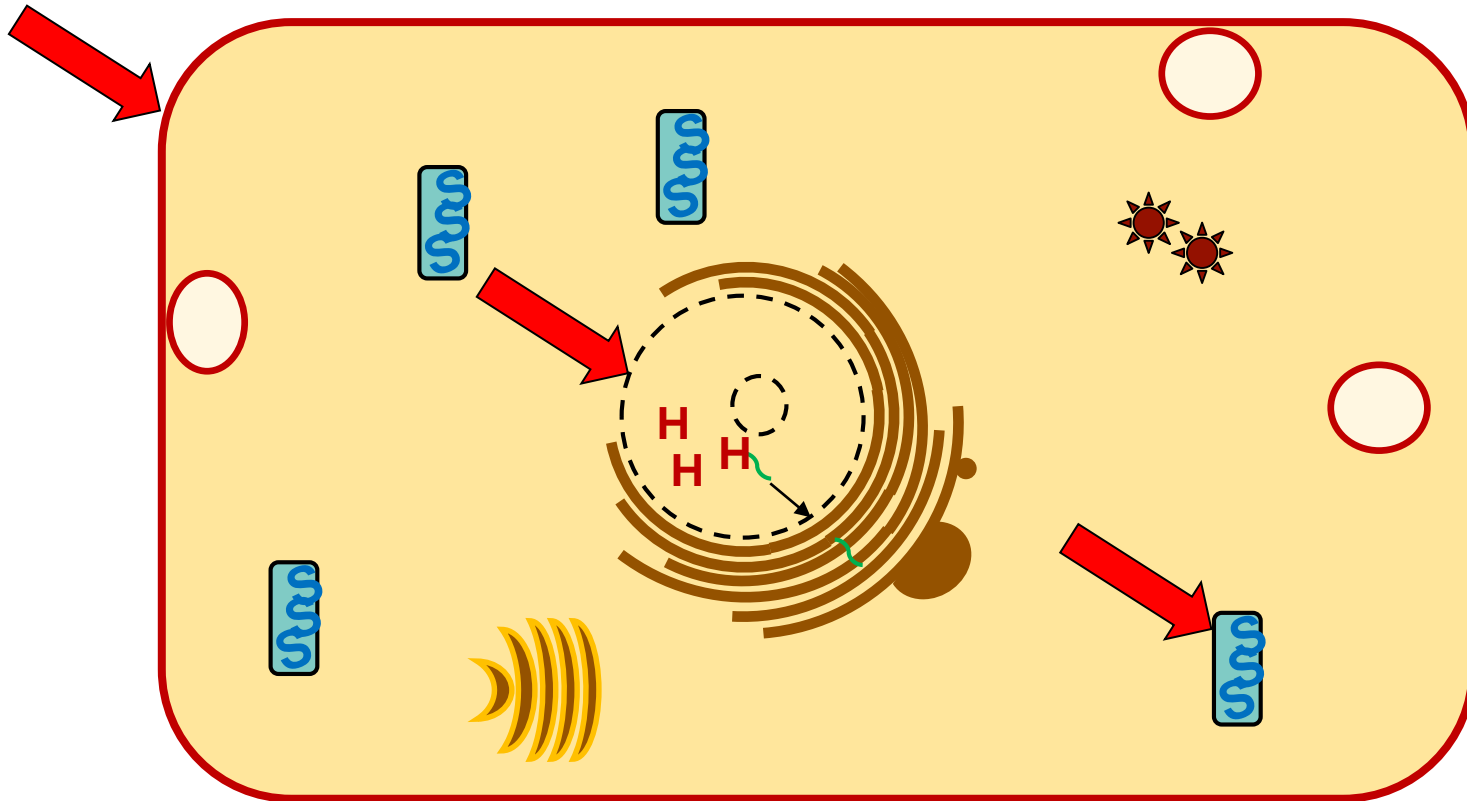
- (Дезокси)рибонуклеїнова кислота
- Притаманна усім (відомим) організмам
- Кодує інформацію для усіх клітинних процесів
- Чотири нуклеотиди у якості будівельних блоків
- Дві пари комплементарних основ
- Може утворювати подвійні ланцюги
- Формує довгі ланцюги
- Усі живі істоти мають РНК та ДНК

Властивості ДНК та РНК



- Знаходиться всередині клітини
- ДНК насамперед для зберігання інформації
- РНК відіграє кілька різних ролей
- ДНК та РНК руйнуються нуклеазами
- РНК більш схильна до деградації
- ДНК і РНК негативно заряджені

Властивості ДНК та РНК

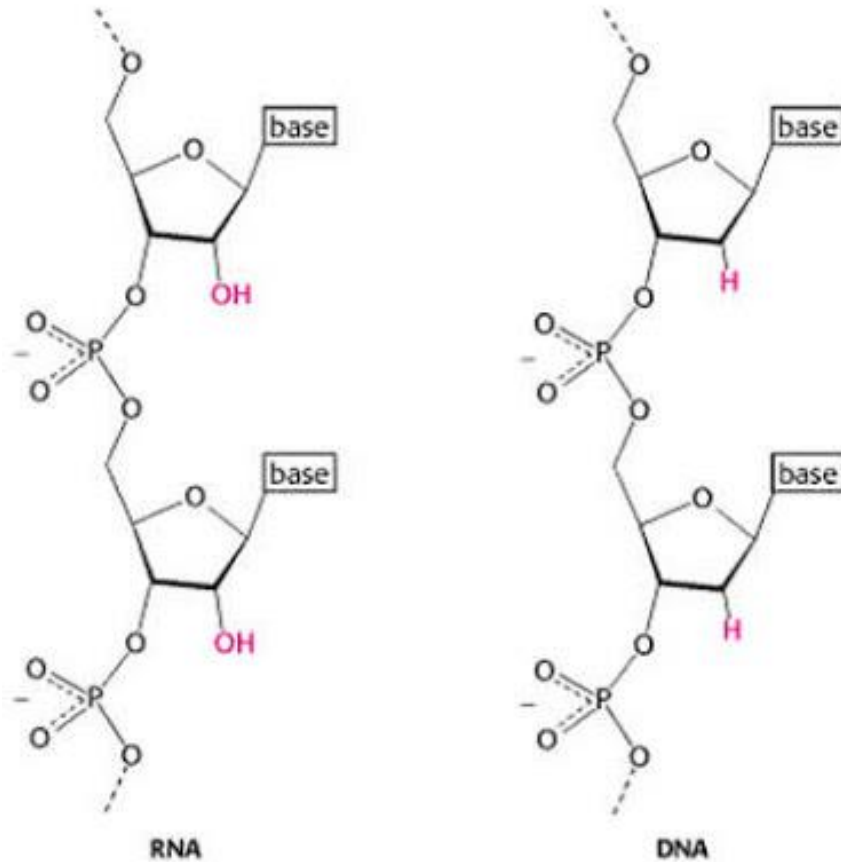


Властивості ДНК та РНК



- Знаходиться всередині клітини
- ДНК насамперед для зберігання інформації
- РНК відіграє кілька різних ролей
- ДНК та РНК руйнуються нуклеазами
- РНК більш схильна до деградації
- ДНК і РНК негативно заряджені

Властивості ДНК та РНК




Принципи - Огляд



- Руйнування клітин (Лізис)
- Очищення ДНК

Розгляд зразків



- На яке питання я намагаюсь відповісти?
- Який матеріал найкращий для цього?
- Який матеріал я можу отримати?
- Яку концентрацію ДНК/РНК я можу очікувати?
- Які там можуть бути контамінанти?
- Які там можуть бути інгібітори?
- Особиста безпека
- Зберігання та транспортування

Підготовка



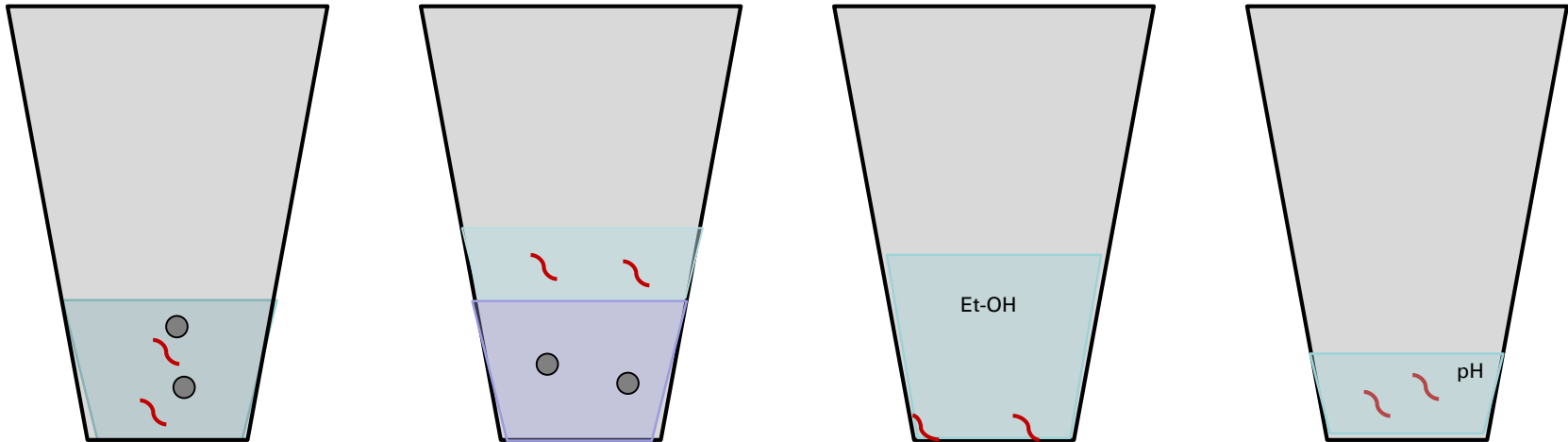
- Планування роботи
- Забезпечення необхідними ресурсами
- Ретельне очищення
- Маркування пробірок
- Особистий захист та захист оточуючого середовища
- Документація

Класична екстракція



- Лізис (детергент, відновлюючий агент, хелатний агент, сіль)
- Денатурація та відділення білку
- Осадження ДНК (спирт)
- Елюція ДНК з використанням води або елюючого буферу

Класична екстракція



Класична екстракція



- Лізис (детергент, відновлюючий агент, хелатний агент, сіль)
- Денатурація та відділення білку
- Осадження ДНК (спирт)
- Елюція ДНК з використанням води або елюючого буферу

Набори для екстракції - Особливості



- Різні набори в залежності від мети (ДНК, РНК, плазміда, геномна, вірусна)
- Часто на основі кремнезему (кульки/колонки)
- Прості у використанні
- Швидше за класичну екстракцію

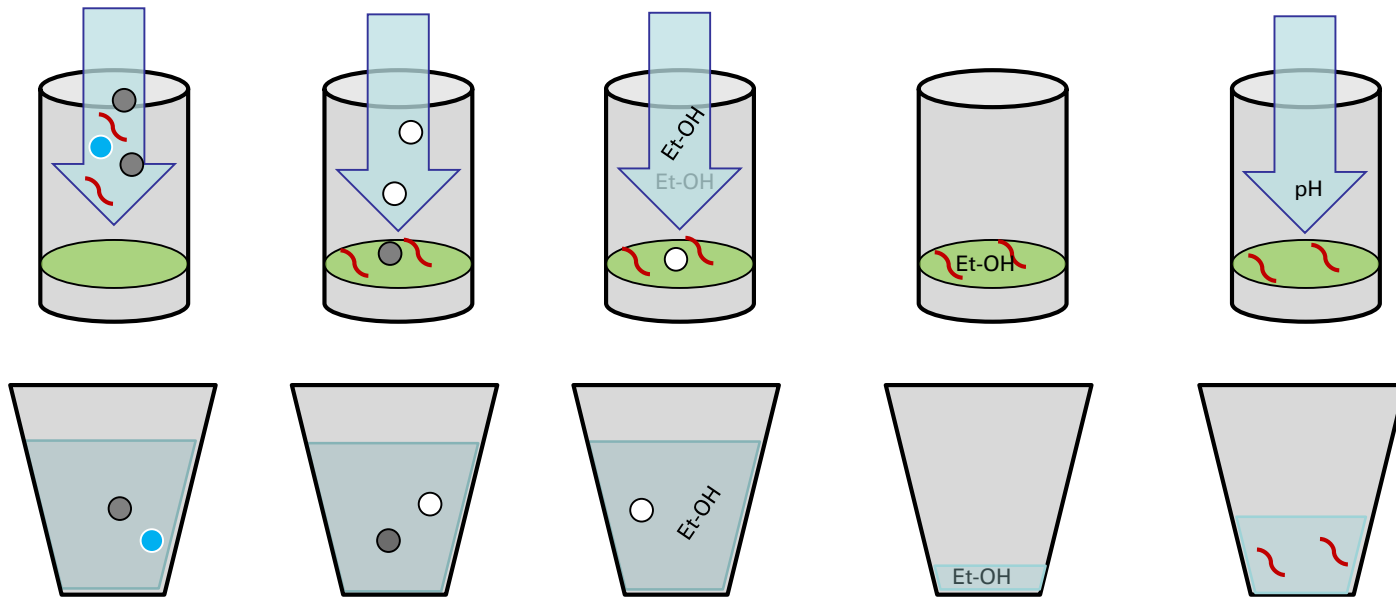
- Дорожче, ніж класична екстракція
- Виявлення та усунення помилок складніші

Принципи наборів для екстракції



- Хаотропні солі для денатурації білку та покращення мембранного зв'язування ДНК
- Адгезивна проникна мембрана, як правило, з кремнезему (силікагелю)
- Відмивання солями, щоб видалити білки
- Відмивання спиртом, щоб видалити солі
- Видалення спирту
- Елюція (оптимальний рівень рН залежить від ДНК/РНК)

Принципи наборів для екстракції



Принципи наборів для екстракції



- Хаотропні солі для денатурації білку та покращення мембранного зв'язування ДНК
- Адгезивна проникна мембрана, як правило, з кремнезему (силікагелю)
- Відмивання солями, щоб видалити білки
- Відмивання спиртом, щоб видалити солі
- Видалення спирту
- Елюція (оптимальний рівень рН залежить від ДНК/РНК)

Набір для екстракції ДНК QIAamp DNA Mini Kit



- Набір на основі колонок
- Для невеликих об'ємів зразків
- Підходить для багатьох різних типів зразків
- Різні початкові фази для різного матеріалу
- Інкубаційний період для лізису може варіювати

Обмеження



- Стратегія схеми дослідження/моніторингу
- Вихідний матеріал
- Умови транспортування та зберігання
- Інгібітори
- Повторне використання ДНК/РНК

Контамінація



- Контамінація на стадії екстракції може бути найбільш оманливою і такою, яку важко точно встановити
- Запобігання та управління будь-якими розливами є дуже важливим
- Екстракцію слід проводити окремо від роботи з контролями та будь-якими продуктами ампліфікації
- Контроль процесу може вказати на контамінацію

Контролі

- Контролі є важливими для оцінки функціонування процедур
- Контролі можуть прямо або опосередковано інформувати про попередні кроки
- Буфер може слугувати негативним контролем (контамінації)
- Очікувана ДНК/РНК (господаря, з навколишнього середовища) може слугувати загальним позитивним контролем
- Плазміда або фактична цільова ДНК/РНК може слугувати специфічним позитивним контролем

Виявлення та усунення помилок



- Яку інформацію про критичні кроки та параметри процесу я маю?
- Документація?
- Концентрація та якість ДНК/РНК?
- Вихідний матеріал?
- Буферні розчини (рН, етанол)?
- Контамінація нуклеазами?
- Контролі/інші зразки?

Запитання?

