

УДК 577.213.3

Н.Е. Аукунов, М.Р. Масабаева, У.У. Хасанова

Государственный медицинский университет города Семей

ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ. СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ НА СОВРЕМЕННОМ ЭТАПЕ

Аннотация

В статье представлены стандартные и инновационные методы выделения ДНК, указаны преимущества и недостатки различных способов экстракции ДНК. Описана качественная и количественная оценка нуклеиновых кислот для получения наиболее полноценной ДНК, позволяющая потом ее использовать в широком диапазоне научных исследований.

Ключевые слова: экстракция ДНК, электрофорез, полимеразно-цепная реакция.

В настоящее время молекулярная генетика одна из самых быстроразвивающихся и перспективных отраслей науки. Ученые всего мира стараются внести свой вклад в развитие молекулярно-генетических методов исследования. Одним из удивительных методов молекулярной генетики является полимеразная цепная реакция, более известная как «ПЦР». Часто ПЦР описывают как метод, с помощью которого ученые могут находить иголку в стоге сена. «Иглой» является крошечный фрагмент генетического материала - ДНК или РНК, а ПЦР позволяет, используя естественное свойство ДНК - репликацию (удвоение), получить множество его копий. Первым этапом ПЦР является экстракция или выделения ДНК, которая необходима для дальнейшего использования самого метода. Процедура выделения ДНК из клеток и тканей часто является исходным этапом в исследовании живого организма на молекулярном уровне [1]. Впервые изоляция ДНК была осуществлена в 1869 году Фридрихом Мишером [2]. Основной задачей данного этапа является получение очищенного препарата ДНК для последующей реакции амплификации. Качество и частота нуклеиновых кислот относятся к наиболее важным факторам успешной постановки ПЦР анализа. Для того чтобы получить высокоочищенные нуклеиновые кислоты необходимо использовать наиболее подходящие методы выделения ДНК. Так же надо учитывать доступность процедуры в повседневной жизни. Для выделения нуклеиновых кислот из биологических материалов необходимо провести лизис клеток, инактивацию клеточных нуклеаз и отделение искомого нуклеиновых кислот от клеточной массы. Часто идеальная процедура экстракции ДНК является компромиссом нескольких методов: она должна быть достаточно жесткой, чтобы разрушить сложную структуру исходного материала (например, тканей), и при этом достаточно деликатной, чтобы оставить в неприкосновенности целевые нуклеиновые кислоты [3]. Нами представлен обзор методов выделения ДНК, описаны их достоинства и преимущества.

Методы выделения ДНК обычно включают следующие этапы:

- 1) лизис клеток;
- 2) осаждение белков;
- 3) центрифугирование для удаления денатурированных белков и фрагментов клеточных органелл;
- 4) осаждение ДНК из раствора этанолом и после центрифугирования растворение осадка в буферном растворе.

Вместе с ДНК частично выделяется и РНК, от которой избавляются с помощью фермента РНКазы. К способам лизиса клеток можно отнести: механическое разрушение (с помощью гипотонического раствора и/или с

применением ультразвука), химическая обработка (лизис с помощью детергентов и хаотропных агентов) и ферментативное расщепление белков (протеинкиназа К) [4]. Осаждение белков. Экстракция растворителями часто используется для удаления примесей из нуклеиновых кислот. Например, комбинация растворителей: фенол и хлороформ часто используется для осаждения и удаления белков. Если содержание целевых нуклеиновых кислот небольшие, к смеси может быть добавлен инертный носитель (такой как гликоген) для того, чтобы увеличить эффективность преципитации. Другие методы осаждения нуклеиновых кислот включают селективную преципитацию с использованием высоких концентраций солей ("высаливание"), либо осаждение белков с использованием переменного pH [3]. Центрифугирование для удаления денатурированных белков и фрагментов клеточных органелл. Проводиться при 1500 грм в течение 15 мин. Осаждение ДНК из раствора возможно с помощью этанола: 96% этанол; изопропанол; очистка 70% этанолом; который считается наиболее часто используемым методом концентрирования ДНК. Растворив полученный осадок в меньшем объеме буферного раствора, получают более концентрированный раствор ДНК. При переосаждении ДНК спиртом происходит ее дополнительная очистка. Этиловый спирт как водоотнимающее средство снижает растворимость нуклеиновых кислот (их солей) в воде. ДНК агрегирует в 70% этаноле в присутствии соли, нейтрализующей фосфатные группы. Преимуществами метода экстракции органическими растворителями являются: получение ДНК хорошего качества и высокой концентрации, выделенная ДНК очень стабильна и хорошо хранится в замороженном состоянии. А недостатками метода можно отметить: высокую токсичность, занимает много времени; не всегда удаляет ингибиторы; трудность автоматизации [4].

Довольно часто количественную и качественную оценку препарату выделенной ДНК в первом приближении дают при гель-электрофорезе, следующем, как правило, сразу за процедурой выделения. Для этого визуально сравнивают на соседних дорожках геля интенсивность свечения в ультрафиолете полученного образца с образцом известной концентрации [1].

Спектрофотометрическое определение концентрации ДНК. Спектрофотометрия (абсорбционная) – физико-химический метод исследования растворов и твердых веществ, основанный на изучении спектров поглощения в ультрафиолетовой (200–400 нм), видимой (400–760 нм) и инфракрасной (>760 нм) областях спектра. Основная зависимость, изучаемая в спектрофотометрии – зависимость интенсивности поглощения падающего света от длины волны λ . В соответствии с

законом Бугера–Ламберта–Бера оптическая плотность раствора прямо пропорциональна концентрации поглощающего вещества. Нуклеиновые кислоты поглощают ультрафиолетовые излучение в области 240–290 нм с максимумом при 260 нм. Хромофорами служат азотистые основания нуклеиновых кислот, особенно пиримидиновые. Пиримидины поглощают ультрафиолетовый свет примерно в 10–20 раз интенсивнее, чем хромофоры белковых молекул – триптофан, тирозин и фенилаланин. Для оценки чистоты препарата ДНК, свободного от РНК, проводят измерения оптической плотности раствора при длинах волн 260, 280 и 235 нм, то есть на максимумах поглощения растворов ДНК, белков и полисахаридов, соответственно. Значение соотношения A_{260}/A_{280} для чистой ДНК должно быть больше 1,8, значение A_{260}/A_{235} должно быть больше, чем 2,2 [1].

Электрофорез нуклеиновых кислот. Электрофорез – это электрокинетическое явление перемещения частиц дисперсной фазы (коллоидных растворов) в жидкой среде под действием электрического поля. Впервые это явление было открыто профессорами Московского университета П.А. Страховым и Ф.Ф. Рейсом в 1809 году. Электрофорез в агарозном геле является стандартным методом для разделения, идентификации и очистки интактных молекул ДНК и их фрагментов (высокомолекулярная хромосомная ДНК всегда фрагментируется при изоляции из клетки). Агароза – фракция природного полисахарида агара. ДНК – это слабая кислота, поэтому она движется к аноду («+») за счет отрицательно заряженных фосфатных групп. За движением ДНК в пластине геля можно следить, так как полосы окрашенной флуоресцентными красителями ДНК, формируемые молекулами одного размера при продвижении через поры геля, видны в ультрафиолетовом свете. Для окрашивания ДНК применяют краситель бромистый этидий *EtBr* ($\lambda_{max} = 590$ нм). Молекулы *EtBr* интеркалируют в молекулы ДНК, то есть встраиваются между соседними парами нуклеотидов. Интенсивность флуоресценции связанного *EtBr* в 20 раз выше, чем свободного. Такая окраска обеспечивает высокую чувствительность: от 10 нг ДНК можно увидеть в виде полосы оранжевого цвета. Применяют и другие красители, в частности *SYBR Green* ($\lambda_{max} = 497$ нм). Длина волны прибора для визуализации ДНК ультрафиолетового трансиллюминатора – 305–320 нм. Скорость движения ДНК через поры агарозного геля при электрофорезе определяется размером молекул и их конформацией [1].

Микрообъемные спектрофотометры серии NanoDrop™ предназначены для измерения ДНК, РНК и белка. Инновационная технология позволяет производить точные измерения столь малых количеств образца как 0,5 мкл и давать данные о концентрации, чистоте и спектральные характеристики. Для проведения спектрофотометрического анализа каплю образца наносят на неподвижный модуль прибора. Сверху на каплю опускают подвижный модуль прибора, в результате чего из образца формируется столбик жидкости между подвижным и неподвижным модулями. Высота столбика регулируется автоматически в диапазоне 0,05–1,00 мм. Прибор измеряет поглощение света в столбике образца. Для точного измерения концентраций изучаемых веществ образцы должны быть очищены от примесей, поглощающих волны той же длины, что и искомые вещества [5].

К другим инновационным методам экстракции ДНК относятся пластинки FTA. В основе метода пластинок FTA лежит целлюлозный фильтр (Ватман ВFC180) пропитанный смесью сильных буферов, которые содержат

реактивы лизирующие клетки, денатурирующие белки и защищающие нуклеиновые кислоты от воздействия нуклеаз, окисления и повреждения ультрафиолетовыми лучами. Пластинки FTA быстро инактивируют микроорганизмы, включая возбудителей, передающихся через кровь. Препятствуют росту бактерий и других микроорганизмов. Клеточные мембраны и органеллы лизируются, а высвобожденные нуклеиновые кислоты удерживаются волокнами пластинки. Нуклеиновые кислоты остаются фиксированными и стабильными; их можно перевозить, анализировать сразу или хранить при комнатной температуре в течение длительного времени. Так как фиксированные нуклеиновые кислоты остаются стабильными, пластинки FTA удобно использовать для отбора проб на большом расстоянии от лаборатории и их транспортировки.

Преимущества этого метода: безопасное обращение с образцами; быстрое выделение высококачественного образца ДНК; длительное хранение образца при комнатной температуре. Недостатками метода, являются: повышенная стоимость реактивов; пригодность только для образцов жидкого типа; количество ДНК, имеющееся на перфорате, невозможно подвергнуть количественному анализу или скорректировать [4].

Метод экстракции с помощью магнитных частиц. Магнитные шарики простой и надежный способ очистки геномной ДНК. В оптимальных условиях, ДНК избирательно связывается с поверхностью магнитных гранул, в то время как другие составляющие клетки остаются в растворе. Очищенную ДНК затем можно использовать непосредственно в исследовании. Основным преимуществом этого метода является то, что нет необходимости в центрифугировании. Экстракции кремниевым шариком (другой способ твердофазной экстракции) завоевали популярность в клинических исследованиях, и представляют собой сочетание магнитных технологий с покрытием кремнезема. При помощи этого метода белки и составляющие клеток удаляются, и остается очищенная ДНК. ДНК связывается с кремнеземом под действием высококонцентрированной соли. Преимуществами метода экстракции с помощью магнитных частиц является: большая емкость сорбента, позволяющая выделять большие количества ДНК/РНК; минимизация потерь в ходе выделения ДНК; уменьшение риска перекрестной контаминации за счет того, что весь нуклеиновый материал связывается с сорбентом; высокая чистота конечного продукта. Существенным недостатком данного метода является его дороговизна [4].

Экстракция с помощью силики. К клеточному экстракту добавляется гуанидинтиоцианат, который денатурирует все компоненты клетки за исключением ДНК. ДНК связывается с частицами силики и далее элюируется в раствор [4]. Преимущества данного метода являются: простота выполнения, простота в использовании, исключаются примеси ингибиторов; есть возможность автоматизации метода. Недостатками экстракции с помощью силики можно отметить сложность в выделении ДНК из объектов с малым количеством биологического материала [4]. В настоящее время чаще используются готовые коммерческие тест-системы (kit) отличающиеся высокой чувствительностью и достоверностью. Так для диагностирования инфекционных заболеваний широко используют экспресс-методы: готовые тест-системы для выделения ДНК «ДНК-экспресс (Литех, Москва), «Проба НК» («ДНК-технология», Москва), из зарубежных тест-систем можно отметить «DNA Purification and Extraction kit» (Promega, USA).

Таким образом, выбор метода экстракции ДНК остается за исследователем, который учитывает эффектив-

ность и доступность вышеперечисленных методик. Экстракция ДНК является комплексным процессом, который требует педантичного отношения. Изначально правильно выбранный метод выделения ДНК дает возможность добиться максимально точного результата полимеразной цепной реакции.

Литература:

1. Великов В.А. Молекулярная биология. Практическое руководство. – Саратов, 2013. –84с.

2. Dahm R., Discovering DNA: Friedrich Miescher and the early years of nucleic acid research // Human Genetics. 2008.

3. Сомма З.М. Анализ образцов пищевых продуктов на присутствие генетических модифицированных организмов. Сессия 4. Выделение и очистка ДНК // Методические рекомендации ВОЗ. - 2010.- 20 с.

4. Кулмаганбетова Г.Н. Современные проблемы биологии. - Астана, 2012. –12с.

Түйіндеме
НУКЛЕИН ҚЫШҚЫЛЫНЫҢ БӨЛУ ЖӘНЕ ТАЗАЛАУ ӘДІСТЕРІ.
МӘСЕЛЕНІҢ ҚАЗІРГІ КЕЗДЕГІ ЖАҒДАЙЫ
Н.Е. Ауқенов, М.Р. Масабаева, У.У. Хасанова

Семей қаласының мемлекеттік медицина университеті

Осы мақалада ДНК-ның стандартты және инновациялық бөлу әдісі, сонымен қатар ДНК-ы бөлінуінің ар инновациялық әдістің артылықшылықтары мен жетіспеушіліктері көрсетілген. Нуклеин қышқылының сапалық және сандық бағалауы туралы айтылады. Бұл ақпарат таза және толық ДНК молекуласын ғылыми зерттеулерде кең қолдануға маңызы зор.

Негізгі сөздер: ДНК экстракциясы, электрофорез, полимеразды тізбелік реакция.

Summary
ISOLATION AND PURIFICATION OF NUCLEIC ACIDS.
STATE OF THE PROBLEM AT THE PRESENT STAGE
N.E. Aukenov, M.R. Massabaeva, U.U. Khassanova
Semey State Medical University

This observatory article consists information about standard and innovational methods of DNA excretion, indicates on advantages and disadvantages of extraction DNA. Describe quality and quantity evaluation of nuclear acids to obtain the most complete DNA, then allowing it to use in a broad range of scientific investigations.

Keywords: DNA extraction, electrophoresis, polymerase-chain-reaction.

УДК 616.24-002.5-08-035

К.С. Игембаева¹, Р.С. Игембаева¹, А. Тусупжанова², А. Оразғалиева², А. Саламатов², А. Строкань²

¹Государственный медицинский университет города Семей,

²Студенты 611 группы, «ВОП», ГМУ г. Семей

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЛЕЧЕНИЯ НОВЫХ СЛУЧАЕВ ТУБЕРКУЛЕЗА ОРГАНОВ ДЫХАНИЯ

Аннотация

В статье проанализированы основные причины низкой эффективности лечения впервые выявленных больных. Невыполнение протокола диагностического алгоритма общей лечебной сетью привело к распространенным процессам, явившимся причиной смерти в 5 (2,8%) случаях. Поздняя обращаемость населения за медицинской помощью и высокий показатель МЛУ ТБ составил 13,7%.

Ключевые слова: туберкулез, органы дыхания, впервые выявленные, лечение.

Актуальность. Оценка эффективности лечения впервые выявленных больных туберкулезом, выделяющих МБТ, изучение особенностей клинического течения, частоты лекарственной резистентности МБТ, остаются актуальной проблемой фтизиатрии. Остаются недостаточно изученными причины неудач лечения больных туберкулезом, сроки развития рецидивов, лекарственно-устойчивых форм туберкулеза, сроки развития мультирезистентного туберкулеза, а также причины хронизации впервые выявленных форм туберкулеза (1-3).

Целью исследования явилось изучение эффективности лечения впервые выявленных больных туберкулезом органов дыхания.

Материалы и методы

Материалом служили истории болезни 174 впервые выявленных больных проходивших лечение в РПТД. Нами проведен ретроспективный анализ медицинской и статистической документации 174 впервые выявленных больных туберкулезом органов дыхания с бациллоделением, зарегистрированных в РПТД и находившихся на лечении в период с 2007 по 2009 год.

Результаты и их обсуждение

Нами обнаружено, что основную часть составили лица от 20 до 39 лет (68,3%), т.е. молодого возраста. Распределение больных по полу показало следующее: мужчин – 94 (54%), а женщин – 80 (46%). Выявлено, что впервые выявленные больные туберкулезом органов дыхания оказались наиболее трудоспособного, молодого возраста, в большинстве случаев с неудовлетвори-