

Методы выделения, очистки и количественного определения ДНК

Дезоксирибонуклеиновая кислота является основным объектом большинства современных молекулярно-генетических исследований. Практически любое исследование, связанное с полимеразной цепной реакцией, генотипированием, секвенированием, клонированием, анализом генетических полиморфизмов или исследованием генома, начинается с получения ДНК. Именно поэтому методы выделения, очистки и количественного определения ДНК относятся к базовым технологиям молекулярной биологии. Даже самый современный секвенатор или высокочувствительная PCR-система не смогут обеспечить надежный результат, если исходная ДНК была получена неправильно, содержит большое количество примесей или подверглась значительной деградации.

Основная цель выделения ДНК заключается в получении из биологического материала препарата нуклеиновой кислоты, который обладает достаточной концентрацией, необходимой степенью чистоты и подходящей молекулярной целостностью для последующего анализа. Важно сразу отметить, что понятия «количество ДНК», «чистота ДНК» и «целостность ДНК» не являются синонимами. Образец может содержать большое количество ДНК, но одновременно быть загрязнен белками, солями или другими веществами. И наоборот, препарат может быть достаточно чистым, но содержать очень небольшое количество ДНК. Кроме того, ДНК может быть химически чистой, но сильно фрагментированной. Поэтому качество полученного препарата всегда оценивается комплексно.

Источником ДНК могут служить практически любые биологические материалы, содержащие клетки или свободную ДНК. В исследованиях человека часто используются цельная кровь, лейкоциты, слюна, различные ткани и клеточные культуры. В микробиологии ДНК получают из бактериальных и грибных клеток, в молекулярной ботанике — из растительных тканей, а в экологических исследованиях ДНК может выделяться непосредственно из воды, почвы, донных отложений и других объектов окружающей среды. В клинических и исследовательских задачах также анализируется внеклеточная ДНК, присутствующая в плазме и других биологических жидкостях. Поэтому универсального метода, одинаково подходящего для всех типов материала, не существует. Выбор технологии всегда определяется характеристиками исходного образца и задачами последующего исследования.

В общем виде процесс получения ДНК можно представить как последовательность: биологический образец, разрушение клеток, освобождение ДНК, удаление белков и других клеточных компонентов, очистка нуклеиновой кислоты, получение конечного препарата, определение концентрации и чистоты, оценка целостности и последующее использование ДНК в молекулярно-генетическом анализе.

Первым важным этапом является разрушение клеток, то есть лизис. ДНК находится внутри клеток, а у эукариот значительная часть геномной ДНК локализована в ядре. Следовательно, прежде чем начать очистку, необходимо разрушить клеточные и ядерные мембраны и освободить генетический материал. Для этого используются химические, ферментативные и механические методы.

В состав лизирующих растворов часто входят детергенты. Они взаимодействуют с липидными компонентами клеточных мембран и способствуют их разрушению. Одним из известных детергентов является SDS — додецилсульфат

натрия. В современных коммерческих системах могут использоваться и другие вещества, состав которых оптимизирован под определенный тип биологического материала.

Важным компонентом многих буферов является EDTA — этилендиаминтетрауксусная кислота. Ее роль связана со способностью связывать двухвалентные катионы, например Mg^{2+} . Это имеет большое значение, поскольку многие нуклеазы, способные разрушать ДНК, нуждаются в двухвалентных ионах для своей активности. Таким образом, EDTA способствует защите выделяемой ДНК от ферментативной деградации.

Еще одним широко используемым компонентом является Proteinase K. Этот фермент расщепляет белки и способствует удалению белковых компонентов клеток, в том числе белков, связанных с нуклеиновыми кислотами. Таким образом, уже на стадии лизиса исследователь решает сразу несколько задач: разрушает клеточные структуры, освобождает ДНК, удаляет часть белков и старается предотвратить разрушение самой нуклеиновой кислоты.

После лизиса образуется сложная смесь. В ней присутствуют ДНК, РНК, белки, липиды, соли, углеводы, компоненты клеточных мембран и другие вещества. Непосредственно использовать такую смесь для большинства молекулярно-генетических исследований нельзя. Следовательно, необходимо отделить ДНК от остальных компонентов.

Одним из классических методов является фенол-хлороформная экстракция. Этот подход сыграл большую роль в развитии молекулярной биологии и до сих пор применяется в некоторых лабораторных протоколах. Основной принцип заключается в различной растворимости биологических компонентов в водной и органической фазах. После добавления соответствующих органических растворителей и центрифугирования смесь разделяется на фазы. При правильно выбранных условиях нуклеиновые кислоты преимущественно остаются в водной фазе, тогда как значительная часть белков и гидрофобных компонентов оказывается в органической фазе или в области межфазной границы.

После разделения фаз водную часть, содержащую ДНК, аккуратно переносят в новую пробирку. Этот этап требует внимательности, поскольку перенос части межфазного слоя может привести к загрязнению препарата белками. Фенол-хлороформная экстракция позволяет получать качественную ДНК, однако метод достаточно трудоемок, плохо подходит для автоматизации и связан с использованием опасных химических веществ. Поэтому в современных лабораториях для большого количества рутинных исследований все чаще используются более стандартизированные системы очистки.

После органической экстракции или на других этапах протокола ДНК может быть осаждена спиртом. Для этого обычно используются этанол или изопропанол в присутствии определенных солей. Изменение свойств раствора приводит к снижению растворимости ДНК, вследствие чего она выпадает в осадок. После центрифугирования ДНК концентрируется на дне пробирки. Осадок можно промыть для удаления остаточных солей и других растворимых компонентов, а затем растворить ДНК в подходящем буфере или воде соответствующего качества. Таким образом, спиртовое осаждение может одновременно использоваться для концентрирования и дополнительной очистки нуклеиновых кислот.

Одним из наиболее распространенных современных подходов является очистка ДНК с использованием силика-матрицы. В лабораториях широко применяются так называемые spin columns — небольшие центрифужные колонки, содержащие специальную мембрану. При определенном составе буфера ДНК связывается с

поверхностью силика-матрицы. После этого через колонку последовательно пропускаются промывочные растворы, удаляющие значительную часть белков, солей и других загрязняющих веществ. На завершающем этапе условия изменяются и ДНК элюируется с мембраны небольшим объемом воды или соответствующего буфера.

Принцип силика-колоночного метода можно запомнить в виде очень простой последовательности: лизис образца, связывание ДНК с мембраной, промывка, удаление загрязнений и элюция очищенной ДНК. Такие системы получили широкое распространение благодаря простоте, относительно высокой скорости, хорошей воспроизводимости и возможности стандартизировать процесс между разными лабораториями.

Еще одним важным современным подходом является использование магнитных частиц, или magnetic beads. Их поверхность обладает свойствами, позволяющими при определенных условиях связывать нуклеиновые кислоты. После связывания ДНК к пробирке или планшету прикладывается магнитное поле. Магнитные частицы фиксируются, а жидкая фаза, содержащая значительную часть примесей, удаляется. Затем частицы несколько раз промываются, после чего ДНК элюируется в чистый раствор.

Главное преимущество магнитных частиц заключается в удобстве автоматизации. Роботизированные лабораторные станции могут одновременно обрабатывать десятки и сотни образцов. Поэтому magnetic-bead технологии широко используются в высокопроизводительных молекулярно-генетических лабораториях, при подготовке образцов к секвенированию и при массовой диагностике.

Существуют и другие методы выделения ДНК. Например, при salting-out белки удаляются с использованием высокой концентрации определенных солей, после чего ДНК дополнительно очищается и осаждается. Такой подход позволяет отказаться от применения фенола. Существуют также специализированные методы для растительных тканей, микроорганизмов, костного материала, парафиновых блоков и других сложных образцов. Например, растительные клетки имеют клеточную стенку и часто содержат полисахариды и полифенольные соединения, которые могут затруднять последующий молекулярный анализ. Поэтому состав буферов и технология очистки должны соответствовать конкретному типу материала.

После выделения ДНК необходимо определить, пригоден ли полученный препарат для дальнейшего исследования. На этом этапе оцениваются три ключевых характеристики: количество, чистота и целостность ДНК.

Количество ДНК обычно характеризуют концентрацией. Она показывает, сколько нуклеиновой кислоты содержится в определенном объеме раствора. В молекулярной биологии концентрацию ДНК часто выражают в нанограммах на микролитр — $\text{ng}/\mu\text{L}$. Например, концентрация $50 \text{ ng}/\mu\text{L}$ означает, что один микролитр раствора содержит приблизительно 50 нанограммов определяемой ДНК.

При этом необходимо различать концентрацию и общий выход. Если концентрация составляет $50 \text{ ng}/\mu\text{L}$, а общий объем образца равен $100 \mu\text{L}$, то расчетное количество ДНК во всем образце будет равно 5000 ng , или $5 \mu\text{g}$. Таким образом, концентрация показывает количество вещества в единице объема, а общий выход характеризует количество ДНК во всем полученном препарате.

Одним из наиболее распространенных методов количественной оценки ДНК является спектрофотометрия. Нуклеиновые кислоты поглощают ультрафиолетовое излучение, причем характерный максимум поглощения находится приблизительно при длине волны 260 nm . Поэтому измерение оптической плотности при 260 nm позволяет оценить содержание нуклеиновых кислот в растворе.

Для двухцепочечной ДНК традиционно используется приближенное соотношение, согласно которому оптическая плотность A260, равная 1, соответствует приблизительно 50 µg/mL двухцепочечной ДНК при стандартных условиях. Поэтому концентрацию можно оценить по величине A260 с учетом коэффициента разведения. В современных микрообъемных спектрофотометрах эти расчеты обычно выполняются автоматически.

Однако преимущество спектрофотометрии заключается не только в определении концентрации. Метод позволяет получить дополнительную информацию о чистоте препарата. Для этого используют отношения оптических плотностей A260/A280 и A260/A230.

Показатель A260/A280 широко используется для приблизительной оценки белкового и некоторых других типов загрязнения. Для относительно чистой двухцепочечной ДНК часто ожидается значение около 1,8. Если отношение существенно ниже, это может указывать на наличие белков, фенола или других компонентов, изменяющих спектр поглощения. При этом необходимо помнить, что значение 1,8 не является абсолютной границей между «хорошей» и «плохой» ДНК. На результат влияют концентрация образца, pH, используемый буфер и особенности прибора.

Вторым важным показателем является A260/A230. Для хорошо очищенных препаратов нуклеиновых кислот значения часто находятся приблизительно в диапазоне 2,0–2,2. Более низкие показатели могут свидетельствовать о присутствии различных химических примесей, например компонентов буферов, солей или органических соединений. Поэтому при оценке препарата желательно рассматривать не один показатель, а совокупность данных: концентрацию, A260/A280 и A260/A230.

Для измерения небольших объемов часто используются микрообъемные спектрофотометры, которые требуют всего нескольких микролитров или даже меньшего объема образца. Это особенно удобно, когда количество выделенной ДНК ограничено.

Несмотря на удобство, спектрофотометрия имеет важное ограничение. Поглощение при 260 нм не является абсолютно специфичным для двухцепочечной ДНК. Если в препарате присутствует РНК, свободные нуклеотиды или другие соединения, поглощающие ультрафиолетовое излучение, прибор может показать более высокую концентрацию, чем фактическое количество интересующей нас двухцепочечной ДНК. Особенно заметной эта проблема становится при работе с образцами низкой концентрации.

Для более селективного определения количества ДНК используется флуориметрический метод. Его принцип заключается в применении специальных флуоресцентных красителей, взаимодействующих преимущественно с определенным типом нуклеиновой кислоты. После связывания красителя с ДНК интенсивность флуоресценции изменяется, а прибор измеряет полученный сигнал.

Для количественного анализа используются стандарты с известной концентрацией. Сигнал исследуемого образца сравнивается с сигналами стандартов, после чего рассчитывается концентрация. Флуориметрические методы особенно полезны при низких концентрациях и в тех случаях, когда необходимо более селективно определить содержание двухцепочечной ДНК.

Поэтому спектрофотометрию и флуориметрию следует рассматривать не как конкурирующие, а как взаимодополняющие методы. Спектрофотометрия особенно полезна для быстрой оценки спектральной чистоты препарата, тогда как флуориметрия позволяет более селективно определить концентрацию определенного типа нуклеиновой кислоты. Например, при подготовке ДНК для NGS часто используется

флуориметрическое количественное определение, поскольку точное количество исходной двуцепочечной ДНК имеет большое значение для подготовки библиотеки.

Следующим важным параметром является целостность ДНК. Даже если препарат имеет хорошую концентрацию и приемлемые показатели чистоты, молекулы могут быть значительно фрагментированы. Одним из простых способов приблизительно оценить состояние геномной ДНК является гель-электрофорез.

При электрофорезе молекулы ДНК перемещаются через гелевую матрицу под действием электрического поля. Высокомолекулярная геномная ДНК преимущественно остается в области больших размеров. Если ДНК подверглась значительной деградации, вместо относительно компактной высокомолекулярной зоны может наблюдаться распределение фрагментов различной длины — так называемый smear. Чем сильнее фрагментирована ДНК, тем больше материала обнаруживается в области коротких фрагментов.

Таким образом, электрофорез дает информацию, которую нельзя получить только с помощью спектрофотометра. Спектрофотометр может показать хорошую концентрацию, но не сообщит непосредственно, являются ли молекулы ДНК длинными или сильно разрушенными. Поэтому методы контроля качества дополняют друг друга.

Качество ДНК особенно важно для PCR. В выделенном препарате могут сохраняться вещества, ингибирующие активность ДНК-полимеразы. Остатки органических соединений, соли и другие загрязнители способны снижать эффективность амплификации. В результате образец с высокой измеренной концентрацией может давать слабый PCR-продукт или вообще не амплифицироваться.

Следовательно, принцип «чем больше ДНК, тем лучше» является неправильным. Избыточное количество матрицы также может создавать проблемы. Для конкретной реакции необходимо использовать количество ДНК, соответствующее оптимизированному протоколу.

Особенно высокие требования предъявляются к ДНК, предназначенной для секвенирования. Для классического секвенирования отдельных PCR-продуктов требования отличаются от требований к подготовке NGS-библиотек. При некоторых технологиях long-read sequencing особенно важна сохранность очень длинных молекул. В таких случаях необходимо минимизировать механическое разрушение ДНК во время выделения, например чрезмерно интенсивное перемешивание.

Большое значение имеет и предотвращение контаминации. Контаминацией называют нежелательное попадание постороннего биологического материала или продуктов предыдущих экспериментов в исследуемый образец. Для PCR это особенно серьезная проблема, поскольку метод способен амплифицировать даже небольшое количество целевой последовательности.

Контаминация может происходить между образцами, через лабораторные поверхности, инструменты, наконечники, реагенты или аэрозоли, содержащие продукты предыдущих PCR. Поэтому работа с ДНК требует правильной организации лабораторного пространства, использования одноразовых расходных материалов, наконечников с фильтрами, регулярной очистки рабочих поверхностей и обязательного применения соответствующих контролей.

После выделения ДНК необходимо правильно хранить. Условия хранения зависят от продолжительности хранения, концентрации, типа образца и последующего применения. Для продолжительного хранения обычно используются низкие температуры. Важно также избегать ненужных повторных циклов замораживания и размораживания, поскольку они могут способствовать повреждению молекул.

ДНК может храниться в специальных буферных растворах. Одним из известных вариантов является ТЕ-буфер, содержащий Tris и EDTA. Tris поддерживает подходящий pH, а EDTA связывает двухвалентные катионы и способствует снижению активности некоторых нуклеаз. Однако при выборе буфера необходимо учитывать последующий эксперимент, поскольку высокая концентрация EDTA может влиять на реакции, зависящие от ионов магния.

Если сравнить основные методы выделения, можно увидеть, что каждый из них имеет преимущества и ограничения. Фенол-хлороформная экстракция является классическим эффективным методом, но требует значительных трудозатрат и использования опасных химических веществ. Силика-колонки просты, удобны и обеспечивают хорошую воспроизводимость, поэтому широко применяются для рутинного выделения ДНК. Магнитные частицы особенно удобны для автоматизации и высокопроизводительной обработки большого количества образцов. Salting-out позволяет избежать использования фенола и может применяться как относительно простой вариант выделения геномной ДНК.

Следовательно, нельзя сказать, что существует один универсально лучший метод выделения ДНК. Метод необходимо выбирать в соответствии с типом биологического материала, количеством образцов, требуемой концентрацией, необходимой длиной молекул, допустимой стоимостью и последующим методом исследования.

Например, если конечной целью является стандартная PCR, требования к целостности геномной ДНК могут быть относительно умеренными, поскольку амплифицируется сравнительно небольшой участок. Если же планируется long-read sequencing, сохранение длинных молекул становится принципиально важным. Если исследователь собирается проводить NGS, большое значение приобретает точное количественное определение исходного материала и соответствие требованиям протокола подготовки библиотеки.

Рассмотрим простой пример. После выделения ДНК из образца крови спектрофотометр показывает концентрацию 80 ng/μL. Можно ли сразу сделать вывод, что получена качественная ДНК? Нет. Сначала необходимо посмотреть показатели A260/A280 и A260/A230. Затем, если требуется точное определение содержания двуцепочечной ДНК, можно выполнить флуориметрическое измерение. Если для последующего исследования важна целостность молекул, необходимо оценить ее соответствующим методом, например электрофорезом или специализированным анализом распределения фрагментов.

Таким образом, правильный вопрос после выделения звучит не «Сколько ДНК мы получили?», а «Сколько ДНК мы получили, насколько она чистая, насколько она целая и подходит ли она для нашего следующего эксперимента?».

В современной лаборатории контроль качества является частью общего принципа обеспечения надежности результата. Ошибка, возникшая на этапе выделения, может проявиться значительно позже. Например, плохая очистка может привести к ингибированию PCR. Неточное определение концентрации может нарушить подготовку библиотеки для секвенирования. Дegradaция ДНК может привести к потере информации о крупных фрагментах. Контаминация может вызвать ложноположительные результаты. Поэтому этап выделения нельзя считать простой технической подготовкой образца — это полноценная и критически важная часть эксперимента.

Общий процесс работы с ДНК можно представить следующим образом: сначала получают биологический материал, затем проводят лизис клеток и освобождают ДНК. После этого удаляют белки, липиды, соли и другие примеси, используя подходящий

метод очистки. Полученную ДНК элюируют или растворяют в соответствующем буфере. Далее измеряют ее концентрацию, оценивают спектральную чистоту и, если необходимо, определяют целостность молекул. Только после этого принимается решение о пригодности образца для PCR, генотипирования, секвенирования или другого молекулярного анализа.

Таким образом, выделение, очистка и количественное определение ДНК образуют единую технологическую цепочку. Лизис обеспечивает освобождение генетического материала. Очистка удаляет компоненты, способные мешать последующим реакциям. Количественный анализ показывает, достаточно ли получено ДНК. Оценка чистоты позволяет выявить возможное присутствие загрязнителей, а анализ целостности характеризует физическое состояние молекул.

Для будущего специалиста по биотехнологии важно понимать не только последовательность лабораторных действий, но и химико-биологический смысл каждого этапа. Необходимо знать, почему разрушается мембрана, для чего используется Proteinase K, почему EDTA защищает ДНК, на чем основано связывание ДНК с силика-матрицей, чем отличается спектрофотометрическое измерение от флуориметрического и почему высокая концентрация еще не означает высокого качества.

Главный вывод данной темы заключается в том, что надежность всего последующего молекулярно-генетического исследования во многом определяется качеством исходной ДНК. PCR, секвенирование и генотипирование не могут полностью компенсировать ошибки, допущенные на этапе подготовки образца. Поэтому правильное выделение и объективный контроль качества являются фундаментом достоверного молекулярно-генетического анализа.



Рисунок 1: Основные этапы выделения и анализа ДНК

В упрощенном виде весь процесс можно запомнить как последовательность: **биологический образец → лизис → освобождение ДНК → очистка → элюция → определение концентрации → оценка чистоты → оценка целостности → молекулярно-генетический анализ.**

После изучения данной темы студент должен понимать, что хорошая ДНК характеризуется не одним числом на экране прибора. Качество определяется совокупностью параметров — количеством, чистотой, целостностью и соответствием требованиям конкретного последующего метода. Именно такой комплексный подход является основой современной практической молекулярной биологии.