

УДК 636.2:579.835.12

Нургалиева М.Т., Жансеркенова О.О., Усенбеков Е.С.,
Касымбекова Ш.Н., Смагулов А.К.

НАО «Казахский национальный аграрный университет», Республика Казахстан

МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

Аннотация

В данной статье рассматривается классификация существующих методик выделения нуклеиновых кислот для проведения ПЦР – анализа в режиме реального времени, с целью исключения ложных результатов исследований. Показаны результаты использования метода магнитной сепарации с использованием автоматизированной станции King Fischer выделения нуклеиновых кислот из различных биологических материалов.

Ключевые слова: пробоподготовка, нуклеиновые кислоты, полимеразная цепная реакция, амплификация, праймеры, магнитные частицы, экстракция.

Введение

Прогресс в освоении методов ДНК- диагностики послужил стимулом для разработки и внедрения в практику высокочувствительных методик оценки качества и экспертизы продуктов питания, основанных на методе полимеразной цепной реакции (ПЦР). В международной практике, принцип специфической ДНК-амплификации активно применяется при разработке методов достоверного определения видовой принадлежности растительного и мясного сырья и многокомпонентных продуктов. Методы, основанные на полимеразной цепной реакции (ПЦР) перспективны для видовой идентификации мясного сырья и мяса в составе продуктов питания и кормов для животных, как в сыром, так и в термически обработанном виде.

Данные методы зарекомендовали себя как специфические и чувствительные, отличающиеся универсальностью, более глубоким уровнем дифференциации, высокой воспроизводимостью и возможностью количественного анализа. Специфичность задается нуклеотидной последовательностью праймеров, что исключает возможность получения ложных результатов. Однако, на полученные результаты влияют степень фрагментации нуклеиновой кислоты, наличие низкомолекулярных примесей, колебание pH и температуры. Метод ПЦР не приемлем в тех случаях, когда в определяемом веществе не сохраняется нуклеотидный материал [1, 2].

Детектирование накопления продуктов амплификации методом ПЦР в пробе невозможно без предварительной очистки нуклеиновых кислот, таким образом, выделение ДНК является важным шагом подготовки проб перед биохимическими и диагностическими процессами.

В настоящее время существуют различные методы, позволяющие выделять нуклеиновые кислоты из широкого спектра образцов, но лишь малое их число пригодно для автоматизации и на многих стадиях выделения есть высокий риск контаминации. Присутствие загрязняющих веществ, например белков или углеводов, в таких комплексных смесях часто мешает реализовать необходимые реакции и методики.

Методы выделения ДНК или РНК должны обеспечивать следующие приоритетные требования: лизис биологического материала, селективную экстракцию (сорбцию), концентрирование из больших объемов, отделение компонентов, которые ингибируют ПЦР, разделение ДНК и РНК, высокий процент выхода, возможность калибровки и

положительного контроля, отсутствие контаминации, малые временные затраты, возможность автоматизации.

Методы выделения нуклеиновых кислот по основным физическим и биохимическим признакам, разделяются на жидкофазные и твердофазные методы.

К жидкофазным методам относятся:

Классические методы выделения нуклеиновых кислот из сложных исходных образцов (ткани, кровь) включают в себя лизис биологического материала детергентами или хаотропными агентами иногда в присутствии разрушающих белки ферментов. Стандартная методика получения чистого препарата основана на том, что ДНК является полярной молекулой и не растворяется в органических растворителях. Традиционно для выделения ДНК используется фенол - хлороформная экстракция. При перемешивании клеточного лизата и фенола формируются две фазы. ДНК находится в верхней (водной фазе), а денатурированные белки – в нижней (органической фазе).

Однако этот метод ориентирован на работу с агрессивными веществами, как фенол и хлороформ, и присутствуют стадии центрифугирования и жидкостной экстракции, которые нельзя автоматизировать.

Известны методы, позволяющие выделить ДНК и РНК одновременно, из одного источника. В данном методе, используются сильные хаотропные агенты, такие как гуанидин тиоцианат и цезия трифлуороацетат для одновременного разрушения клеточных мембран и инактивации внутриклеточных рибонуклеаз. Лимитирующими факторами таких методик является необходимость ультра центрифугирования и большое время анализа.

Методы одновременного выделения ДНК и РНК, в которых не присутствует операция центрифугирования, имеют преимущество, фенол действует как эффективный депротеинизирующий агент, разрушающий клетки и денатурирующий белки.

В твердофазных методах выделения нуклеиновых кислот используются следующие процессы и принципы: водородные связи с немодифицированной гидрофильной матрицей, обычно кварцем, в хаотропных условиях, ионообмен в водном растворе, обычно с использованием анионообменников, аффинность, механизмы исключения по размеру.

Метод выделения нуклеиновых кислот на стекле включает в себя стадию лизиса клеток сильным хаотропным агентом, который разрушает клеточные мембраны и инактивирует внутриклеточные рибонуклеазы, и последующую сорбцию нуклеиновой кислоты на носителе (стеклянные бусы, диатомовая земля, стеклянное «молоко» и т.д.).

Очищенная нуклеиновая кислота снимается со стекла буфером с низкой ионной силой. В настоящее время многие коммерческие фирмы предлагают для выделения нуклеиновых кислот колонки со стеклянной матрицей (например, Zymo Research, Promega). Методы, эксплуатирующие эти колонки, включают стадии центрифугирования или вакуумирования, однако занимают порядка 15 минут.

Использование магнитных твердых носителей в биохимических и молекулярно-биологических процессах имеет много преимуществ по сравнению с немагнитными сепарационными методами. Метод на основе магнитной сепарации: для автоматического выделения нуклеиновых кислот используются магнитные частицы со стеклянным покрытием. Нуклеиновая кислота связывается со стеклянной поверхностью, затем связанная с частицами она проходит стадии экстракционного процесса, после серии отмывок в пробе остается нуклеиновая кислота, собранная на носителе, с которого она легко снимается с помощью элюирующего буфера [3].

Метод удобен, технологичен и пригоден для подготовки образца к амплификации, его можно воспроизвести на роботизированных пипеттирующих рабочих станциях. Недостатками данного метода являются возможные потери продукта в следствии необратимой сорбции на носителе, а так же в процессе многочисленных отмывок. Особенно большое значение это имеет при работе с небольшими количествами ДНК в образце. В

настоящее время доступны различные магнитные частицы с оптимизированными буферами и протоколами для лабораторий и автоматических систем для подготовки образцов [4]. Целью наших исследований являлось сравнительное изучение различных методов выделения ДНК на ПЦР анализ.

Материалы и методы исследования

В учебной научной диагностической лаборатории Казахстанско – Японского инновационного центра Казахского национального аграрного университета проводили сравнительные исследования методов выделения ДНК из мясного сырья и мясных продуктов, влажной слизи коров, культуры микроорганизмов. Исследования проводились согласно ГОСТ 31719-2012 «Продукты пищевые и корма. Экспресс-метод определения сырьевого состава (молекулярный)» [5].

С диагностической целью для выделения геномной ДНК из исследуемого материала, для ПЦР анализа каждый образец влажной слизи брали от коров отдельным набором инструментов в 1,5 см³ пробирки Эппендорфа и также отдельно в 1,5 см³ пробирки Эппендорфа были взяты для микробиологических исследований. Затем 10 образцов влажной слизи с антибиотиком были подвергнуты микробиологическим исследованиям с целью выделения культуры и идентификации *Campylobacter fetus*. Для ПЦР анализа 10 образцов влажной слизи, отстаивали при комнатной температуре в течение 30 мин. и центрифугировали при 12 тыс. об/мин, затем удалили надосадочную жидкость и добавили 0,5 см³ лизирующего буфера и использовали для выделения ДНК.

Выделения геномной ДНК из исследуемых образцов биологического материала осуществляли классическим методом фенол-хлороформной экстракции, сорбентным методом и методом магнитной сепарации набором KF_TissueDNA_KF с помощью автоматической станции выделения НК King Fisher Thermo Scientific согласно протоколам процедуры. Для выделения ДНК из бактериальных клеток брали по 10 мкл суспензии. Контроль качества и количества очищенной ДНК определяли NanoDrop 2000, и с помощью 1% агарозного геля определяли размер экстрагированной ДНК.

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты выделения геномной ДНК из 10 образцов исследуемого материала показаны на рисунке 1. В первую очередь учитывали такие параметры как количество и качество выделенной ДНК от которой в значительной степени зависит амплификация ПЦР. Необходимо отметить быстроту и минимальный риск контаминации метода выделения с помощью магнитных частиц.

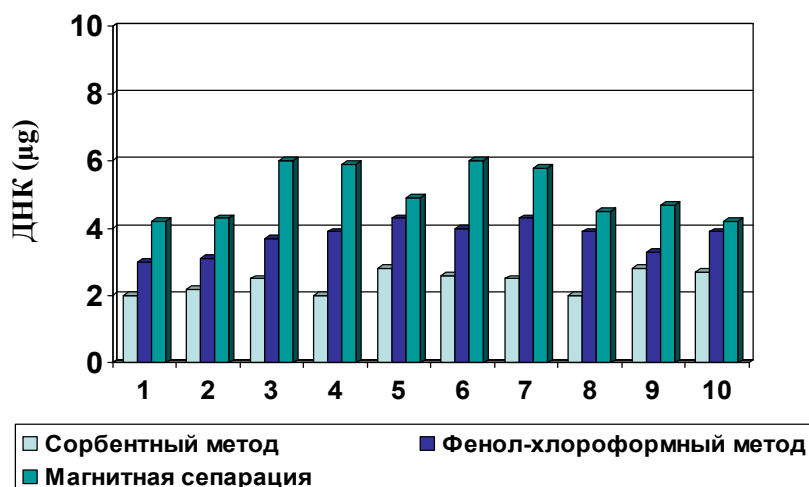


Рисунок 1. Количество ДНК каждого образца (µg/µl).

Дополнительно был проведен электрофорез в 2% агарозном геле, чтобы определить размер и степень очистки выделенной ДНК. Электрофореграмма показывает (рисунок 2), что генетический материал высокого качества и достаточной концентрации для ПЦР анализа, которые были получены методом фенол-хлороформной экстракции и методом магнитной сепарации набором KF_TissueDNA_KF. При этом следует отметить выход ДНК полученный с помощью сорбентного метода, в среднем примерно в 1,6 раза ниже, в сравнении с методом экстракции фенолом и методом автоматического выделения с помощью магнитных частиц.

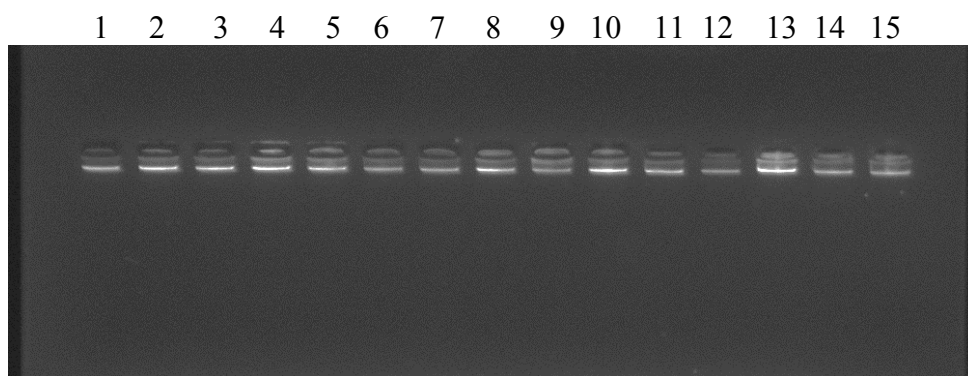


Рисунок 2. Электрофореграмма ДНК в агарозном геле полученная методом фенол-хлороформной экстракции (№1-7) и методом магнитной сепарации набором KF_TissueDNA_KF (8-15).

ПЦР-анализ в значительной степени зависит от качества экстрагированной ДНК. Для ПЦР и ПЦР в режиме реального времени, амплификацию проводили с одинаковым объемом образцов ДНК (5 мкл ДНК с концентрацией 20-40 ng/mkl), полученные различными методами экстрагирования из образцов исследуемого материала: классическим методом фенол-хлороформной экстракции, сорбентным способом и методом магнитной сепарации набором KF_TissueDNA_KF. ПЦР-амплификация ДНК, выделенная с использованием протокола метода магнитной сепарации набором KF_TissueDNA_KF оказалась эффективной, как и ПЦР-амплификация с использованием ДНК фенольной экстракции.

Заключение

Автоматизированное извлечение ДНК методом магнитной сепарации из образцов биологического материала, мясного сырья, влагалищной слизи коров может выполняться для ПЦР диагностики, ПЦР в режиме реального времени, что важно для анализа биологических образцов, несмотря на то, что концентрация ДНК невысокая в сравнении с другими методами, здесь амплификация экстрагированной ДНК является гораздо более эффективной и позволяет получать воспроизводимые результаты высокой степени точности. Необходимо отметить, что выделение ДНК с помощью автоматической станции King Fisher Thermo Scientific ускоряет процесс изоляции ДНК из различных биологических материалов, однако, недостатком данного способа является высокая себестоимость реактивов, расходных материалов и низкая концентрация полученной ДНК.

Литература

1. Козлова Т.А. К вопросу безопасности контроля качества мясного сырья и мясных продуктов в России//Российский журнал агрокультуры и социально-экономических наук, № 5(5)/2012, с.33-38

2. *Остроумов Л.А., Просеков А.Ю., Архипов А.Н., Мудрикова О.В.* Метод выделения растительной ДНК из растений и продуктов питания на их основе//Известия Самарского научного центра Российской академии наук, №4(3)/2010, т.12, с.722-724.

3. *Антонова О.С., Корнева Н.А., Белов Ю.В., Курочкин В.Е.* Эффективные методы выделения нуклеиновых кислот для проведения анализов в молекулярной биологии (обзор)//Научное приборостроение, №1/2010, том 20, с.3-9.

4. *Berensmeier S.* Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. Appl. Microbiol. Biotechnol. 73, (2006) 495-504.

5. ГОСТ 31719-2012 «Продукты пищевые и корма. Экспресс-метод определения сырьевого состава (молекулярный)».- М.:Стандартинформ, 2013

Нургалиева М.Т., Жансеркенова О.О., Усенбеков Е.С.,
Қасымбекова Ш.Н., Смагулов А.Қ.

НАҚТЫ УАҚЫТ МЕЗГІЛІНДЕ ПОЛИМЕРАЗДЫҚ ТІЗБЕК РЕАКЦИЯСЫН ЖҮРГІЗУГЕ ҚАЖЕТ НУКЛЕИН ҚЫШҚЫЛДАРЫН БӨЛУ ӘДІСТЕРІ

Аңдатпа

Ғылыми мақалада осы мезгіл ырғағында полимераздық тізбек реакциясын жүргізуге қажет нуклеин қышқылдарын бөлу әдістеріне талдау жасалған және қате нәтиже алмау мақсаты көзделген. Экспериментальдық жұмыста нуклеин қышқылдарын бөліп алуға автоматтандырылған King Fischer жүйесімен магниттік бөлшектермен сепарация жасау техникасын қолдану нәтижелері берілген.

Кілт сөздер: сынама дайындау, нуклеин қышқылдары, полимераздық тізбек реакциясы, амплификация, праймерлер, магниттік бөлшектер, экстракция.

Nurgaliyeva M.T., Zhanserkenova O.O., Ussenbekov Y.S.,
Kasymbekova Sh.N., Smagulov A.K.

METHODS THE ISOLATED NUCLEIC ACIDS FOR POLYMERASE CHAIN REACTION IN REAL TIME

Annotation

This article discusses the classification of existing nucleic acid extraction methods for PCR -analysis in real time, in order to avoid false test results.

The results of using the method of magnetic separation using automated nucleic acid extraction station King Fischer.

Keywords: sample preparation, nucleic acid, polymerase chain reaction amplification, the examples, magnetic particles, extraction.