

Выделение нуклеиновых кислот. Выбор метода.

Алексей Жигулин, ООО «Силекс», info@sileks.com

21 марта 2021 года

Актуальность задачи по выделению нуклеиновых кислот, ДНК и РНК, растет по мере того, как увеличивается количество методик, позволяющих использовать информационную базу данных, закодированную в их последовательностях. Сегодня на основе анализа нуклеиновых кислот можно выявлять как экзогенные (вирусы и бактерии, проникшие в наш организм), так и эндогенные угрозы (ранние признаки рака, генетические нарушения, приводящие к развитию различных заболеваний), можно следить за генетическим здоровьем еще не родившегося ребенка, отследить свою родословную до N-ого колена, даже попытаться оценить собственные успехи в различных видах деятельности. И для такого анализа нужна только маленькая, иногда совсем микроскопическая, часть нашего организма. Иногда даже уже не нужная организму, как слюна, моча, фекалии или выпавшие волосы.

Еще 50 лет назад счастлив был исследователь, который хотел заниматься нуклеиновыми кислотами. Методов выделения было так мало, их передавали устно, переписывали друг у друга. Они были как библия, не верить было нельзя – только так и никак по-другому. Но времена менялись. Пришли те, кто не верил, кто сомневался в правильности предложенного. Стали появляться новые методики, которые работали лучше. Теперь каждый считал, что он знает, как надо. В результате – бесконечное количество вариантов, а истина, как известно, где-то там.

Если посмотреть на форумах, где обсуждаются методы выделения нуклеиновых кислот, то не найти единства – каждый рекомендует свое, проверенное, но не всегда подходящее другому.

Задача этой статьи – постараться разобраться в том, почему нет универсального метода и как в бесконечном море вариантов искать свой метод, свой островок стабильности и успеха.

Немного истории

Фридрих Мишер был первым ученым, выделившим ДНК при изучении химического состава клеток. В 1869 году он использовал лейкоциты, которые он собрал из образцов на свежих хирургических повязках, и провел эксперименты по очистке и классификации белков, содержащихся в этих клетках. Во время своих экспериментов он идентифицировал новое вещество в ядрах, которое он назвал «нуклеином» [1]. Затем он разработал два протокола для отделения ядер клеток от цитоплазмы и выделения этого нового соединения, сегодня известного как ДНК, которое отличалось от белков и других клеточных компонентов. Это научное открытие, наряду с использованными протоколами выделения, было опубликовано в 1871 году в сотрудничестве с его наставником Феликсом Хоппе-Зейлером [1, 2]. Однако только в 1958 году Мезельсон и Шталь [2,3] разработали рутинную лабораторную процедуру выделения ДНК. Они провели выделение ДНК из бактериальных образцов *Escherichia coli*, используя протокол центрифугирования в градиенте плотности соли. С тех пор методы выделения ДНК были адаптированы для извлечения из многих различных типов биологических источников.

Методы выделения (или экстракции) ДНК следуют некоторым общим процедурам и состоят из этапов, направленных на эффективное разрушение клеток, денатурацию нуклеопротеиновых комплексов, инактивацию нуклеаз и других ферментов, удаление биологических и химических загрязнителей и, наконец, осаждение ДНК [4]. Большинство из этих методов следуют аналогичным основным этапам и включают использование органических и неорганических реагентов и методов центрифугирования.

Методы выделения ДНК нельзя напрямую применять к РНК, поскольку РНК структурно сильно отличается от ДНК. РНК в основном одноцепочечная, а ДНК в основном двухцепочечная. Часто бывает сложно выделить интактную РНК. РНКазы, группа ферментов, разрушающих молекулы РНК, широко распространены в окружающей среде, в том числе на руках и поверхностях, и полностью удалить или разрушить РНКазы сложно. В дополнение к РНКазам есть целый ряд других ферментов, способных разрушать РНК. Таким образом, для выделения РНК требуется осторожное обращение с образцами и соблюдение правил асептики. При экстракции важно использовать не только растворы, не содержащие РНКазы, а также наконечники для пипеток и стеклянную посуду, не содержащие деградирующих РНК агентов.

В одном из самых ранних методов для выделения РНК использовался гуанидин тиоцианат для лизиса клеток и денатурации белков в сочетании с ультрацентрифугированием с подушкой из хлорида цезия для отделения РНК от клеточных компонентов [5]. Альтернативные методы с использованием горячего фенола заменили центрифугирование в градиенте хлорида цезия [6], но позволяли получать РНК не всегда высокого качества [7]. Методы, сочетающие гуанидин тиоцианат и фенол для выделения РНК, улучшили качество РНК [9].

Использование гуанидин тиоцианата для выделения РНК впервые было упомянуто Ulrich [10] и Chirgwin [11]. Этот метод тоже был достаточно утомительным. Поэтому он и был заменен одностадийной техникой, известной как экстракция гуанидин тиоцианат-фенол-хлороформ, Chomczynski [8, 9, 12], при этом гомогенат

экстрагируется смесью фенол-хлороформ при кислом pH. Гуанидин тиоцианат представляет собой хаотропный агент, используемый для денатурации белков. Основной принцип этой одношаговой методики состоит в том, что РНК переходит в водную фазу с кислым раствором, состоящую из гуанидина тиоцианата, ацетата натрия, а органическая фаза состоит из фенола и хлороформа [8]. В кислых условиях вся РНК будет находиться в верхней водной фазе, в то время как ДНК и белки остаются в интерфазе или ниже в органической фазе. Затем РНК осаждается с помощью изопропанола.

Основные методы выделения нуклеиновых кислот

Основные методы выделения нуклеиновых кислот делятся на следующие большие группы:

1. несорбционные методы
2. сорбционные методы
3. другие

1. Несорбционные методы

К несорбционным относятся:

1.1. методы с обязательным использованием фенола, хлороформа, гуанидин тиоцианата

Основные этапы, используемые в этих методах, включают: 1) лизис клеток, осуществляемый путем добавления раствора, содержащего детергент (Triton X-100 или подобные), хаотроп (гуанидин тиоцианат), SDS или N-лауроилсаркозин; 2) инактивация ДНКаз и РНКаз, обычно с использованием органических компонентов (фенол, хлороформ); 3) очистка ДНК и РНК, удаление липидов и белков; и 4) экстракция очищенных нуклеиновых кислот.

1.2. методы с использованием солевых растворов (высаливание)

Традиционный протокол включает начальное разрушение клеток и переваривание протеиназой К или другими протеолитическими ферментами с последующим добавлением солей в высоких концентрациях, обычно 6 М хлорида натрия. Затем смесь центрифугируют, чтобы белки выпали на дно, а супернатант, содержащий ДНК, переносят в новый флакон. Затем ДНК осаждают этанолом или изопропанолом таким же образом, как описано для метода с использованием органических компонентов. Для выделения РНК часто используют соли лития (LiCl). Выделение с солями лития позволяет получать чистые препараты РНК.

Использование центрифугирования в солевом градиенте (обычно, CsCl) можно использовать в комбинации с любым несорбционным методом – 1.1 или 1.2. Чистота нуклеиновой кислоты, получаемой с центрифугирования в градиенте хлористого цезия, является эталоном, несмотря на развитие альтернативных методов очистки.

2. Сорбционные методы

2.1. выделение на силикатных сорбентах (силика)

Принцип выделения на силикатных сорбентах описан подробно в разных статьях и обзорах. Силикатные сорбенты могут быть немагнитные (используются как отдельные сорбенты, так и в виде спин-колонок), магнитные. Этот тип сорбента является на сегодняшний день одним из самых распространенных. Популярность этого типа сорбента можно объяснить тем, что в отличие от других сорбентов, описываемых ниже, этот тип сорбента имеет много разных модификаций. В сочетании с различными вариантами всевозможных химических компонентов это позволяет создавать программируемые условия для избирательной сорбции для отдельных типов нуклеиновых кислот и уменьшать сорбцию нежелательных примесей.

2.2. выделение на ион-обменных сорбентах

Сорбенты с определенным типом заряда на поверхности могут или избирательно связывать нуклеиновые кислоты (например, SileksMagNA-Direct, фирма Силекс) или другие компоненты, например белки (сорбент BlueSorb, фирма Клоноген). При связывании нуклеиновых кислот сила связывания ДНК и РНК с сорбентом, а также других примесей может быть изменена с помощью концентраций солей, дополнительных химических компонентов и условий pH буферов, используемых в протоколе выделения нуклеиновых кислот. Загрязняющие вещества, такие как белок и другие примеси, можно вымыть с использованием несложных буферов. Еще один пример - смола Chelex® 100 (Bio-Rad Laboratories, Геркулес, Калифорния, США), который состоит из сополимеров стирола и дивинилбензола, содержащих парные иминодиацетатные ионы. Он используется в протоколах выделения ДНК в качестве хелатирующей ионообменной смолы, которая связывает ионы поливалентных металлов, такие как нуклеазы, и обычно используется при извлечении ДНК из образцов судебно-медицинской экспертизы. Первоначальный

лабораторный протокол с использованием крови в качестве биологического источника был описан Walsh в 1991 году [13]. На основе этого первоначального подхода были разработаны другие протоколы для выполнения выделения нуклеиновых кислот из образцов цельной крови. Они требуют небольших объемов образцов и обычно проводятся в одной пробирке с различными этапами и применяемыми реагентами. Образцы крови можно лизировать с использованием протеиназы К или инкубацией при высокой температуре, а удаление загрязняющих веществ достигается добавлением смолы Chelex® 100, которая осаждает их. Получается одноцепочечная ДНК, которая остается суспендированной в супернатанте и которую можно сразу использовать в последующих приложениях или перенести в новую пробирку для длительного хранения.

2.3. выделение на других сорбентах

Нуклеиновые кислоты, как ДНК, так и РНК, могут сорбироваться также с разной степенью эффективности на поверхности бесконечного количества материалов. Такими сорбентами могут выступать:

- минералы различного происхождения (например, апатиты)
- частицы разных металлов и их оксиды
- полимеры органической и неорганической природы

Практически, сорбентом может служить любой материал. Сложнее найти материал, который не сорбировал бы нуклеиновые кислоты. Способность нуклеиновых кислот к сорбции на разных материалах требует грамотного выбора материала (посуды, пробирок, наконечников и т.п.) для работы с нуклеиновыми кислотами, так как связывание ДНК и РНК на пластике в процессе выделения может привести к значительному искажению результатов.

2.4. выделение на поверхностях

Выделение на поверхностях является частным случаем выделения на тех или иных типах сорбентов. Примерами выделения на поверхностях можно считать 1) электрохимическое выделение нуклеиновых кислот на специальных электродах, 2) выделение на чипах с пришитыми зондами, 3) выделение специальными наконечниками, где частицы пришиты к поверхности (DC – Dual Chemistry, Analytik Jena). Если выделение при помощи наконечников со «smart (умной)» поверхностью можно считать измененным фактором обычного сорбента (как спин-колонка), то электрохимическое выделение определенно представляет собой новое направление.

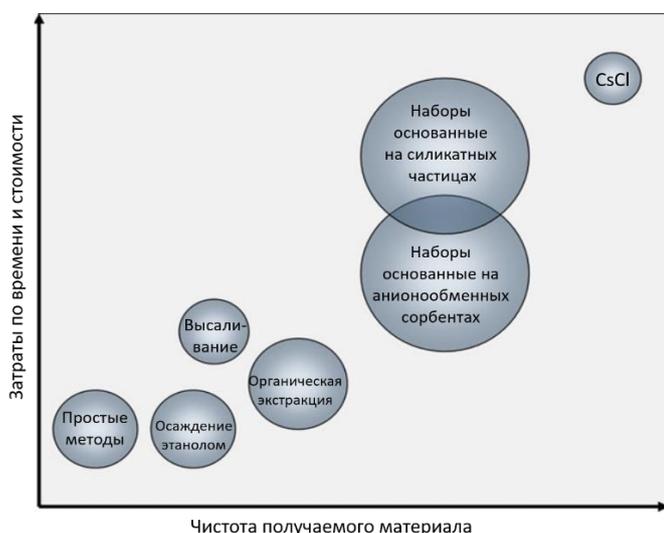


Рис.1. Зависимость стоимости и чистоты выделяемой нуклеиновой кислоты от метода выделения

На приводимом рисунке приблизительно показано, как соотносится стоимость и чистота выделяемой нуклеиновой кислоты от применяемого метода выделения.

Нужно честно признать, что не всегда методы, основанные на наборах с сорбентами дают лучшие результаты. Также как и классические простые методы при правильном использовании дают возможность получать нуклеиновые кислоты достаточно высокой степени чистоты. Если не принимать в расчет вопрос стоимости, то качество выделения определяется конкретным исполнением самой процедуры выделения с использованием реактивов нужного качества и хорошо отработанного протокола.

3. Другие

К другим можно отнести методы, которые пока малоизвестны. Один из таких методов - выделение нуклеиновых кислот с использованием электрохимической платформы. Сюда входят не только разного рода биосенсоры и биочипы, но и совершенно новые методы, позволяющие проводить обратимое связывание нуклеиновых кислот на основе таких платформ. Развитие этих методов идет пока незаметно, но за ними, скорее всего, будущее для использования в медицинских диагностических применениях.

Критерии для выбора метода выделения нуклеиновых кислот

Идеальный метод выделения должен соответствовать следующим критериям:

1. должен соответствовать поставленной задаче
2. быть понятным и простым в использовании, а в зависимости от страны, в которой он используется, может быть важно свести к минимуму специализированное оборудование или биохимические знания
3. быть воспроизводимым
4. быть исчерпывающим (обеспечивать максимально полное выделение)
5. выбранный метод выделения ДНК и/или РНК должен обеспечивать получение образцов, готовых к использованию в последующих молекулярных и технических приложениях
6. возможность автоматизации процедуры выделения

При выборе метода некоторые критерии могут иметь приоритет, иногда приоритетными могут быть несколько критериев сразу, но чаще всего истинный приоритет всегда один, а остальные критерии выступают в качестве дополнения.

Рассмотрим каждый критерий по отдельности.

1. Соответствовать поставленной задаче

Метод выделения всегда определяется задачей.

Что нужно выделять:	ДНК, тотальную РНК, мРНК, микро РНК, тотальную нуклеиновую кислоту.
Из чего нужно выделять:	кровь, плазма или сыворотка, соскобы, ткань, клетки, кости, слюна, моча, парафинированные блоки, волосы, растения, пищевые продукты, объекты органического или неорганического происхождения для криминалистического анализа.
Для чего нужно выделять:	для молекулярно-биологических процедур (клонирование, рестрикция, секвенирование, гибридизация, блоты и т.п.), для медицинских исследований (полимеразная цепная реакция, секвенирование и т.п.), для физических методов анализа (кристаллография, электронная микроскопия и т.п.).
Количество исходного материала:	неограниченное, ограниченное, критически малое.
Возможность повторить выделение:	без ограничения, возможность нескольких повторений, единственная возможность

Возможно, какая-то задача не вошла в приведенный перечень, но смысл, думаю, понятен.

Определившись с задачей, как правило, всегда становится понятно, какой метод лучше применить.

Например, для рутинного выделения хромосомальной ДНК из бактерий или геномной ДНК из крови для молекулярно-биологической лабораторной задачи совершенно нет необходимости использовать коммерческие наборы. И наоборот, для выделения из единственного крохотного образца костной ткани для криминалистического или медицинского анализа лучше воспользоваться коммерческим набором.

2. Быть понятным и простым в использовании, быть адаптированным к месту применения

Бывают случаи, когда профессиональные возможности персонала лаборатории или ее техническое оснащение не позволяют использовать определенные методы. Так, в некоторых лабораториях есть проблемы с одноразовым пластиком или пластиком нужного качества, отсутствуют скоростные центрифуги, персонал не имеет соответствующую квалификацию и возможность выполнять работу определенного уровня сложности.

3. Воспроизводимость

При всей серьезности этого понятия, воспроизводимость метода выделения имеет решающее значение исключительно в медицинских, криминалистических и аналитических исследованиях. В научных исследованиях воспроизводимостью часто пренебрегают в угоду простоте, в зависимости от задачи.

4. Максимально полное выделение

Максимально полное выделение для максимальной чувствительности имеет решающее значение исключительно в медицинских, криминалистических и аналитических исследованиях. В научных исследованиях максимально полное выделение в большинстве случаев не имеет решающего значения. Часто, большее значение имеет корректное соотношение определенных нуклеиновых кислот в образце, например соотношение геномной ДНК к определенным мРНК, позволяющее вести оценку уровня экспрессии и нормализацию. Большинство современных методов и наборов на их основе позволяют выделять максимальное количество нуклеиновой кислоты из исходного образца. Проблемой остается качество получаемого материала, которое сказывается на чувствительности в последующих этапах анализа.

5. Метод выделения должен обеспечивать качество в последующих приложениях

В одних приложениях качество выделения имеет большое значение, в других – меньше. Для анализа ДНК при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) могут использоваться любые методы выделения. Современный ПЦР хорошо работает с ДНК имеющую разного рода примеси. Часто в реакционную смесь можно вносить необработанный образец (кровь, кусочек ткани, клетки и т.п.) и результат будет хорошим.

Для дальнейшего анализа выделенной РНК часто требуется наработка кДНК в реакции синтеза первой цепи (обратной транскрипции). На эту реакцию в значительно большей степени влияют примеси, остающиеся при выделении РНК. Как правило, методы выделения РНК более сложны и дают значительно больше расхождений по качеству.

6. Возможность автоматизации

Ни один метод выделения нуклеиновых кислот при использовании его со средствами автоматизации полного цикла не дает тех же результатов, как при ручном режиме выделения. Причин для такого расхождения в качестве выделения может быть много и все они зависят от прибора конкретного производителя и конкретного набора или метода, который стараются автоматизировать. Решением проблемы мог бы быть прибор, созданный под конкретные наборы (здесь возникает новая проблема – привязка прибора к конкретному производителю наборов) или разработка совершенно новой технологии, использующей другие принципы в методе выделения и анализа.

Заключение

Здесь специально не приводилось сравнений «классических» методов выделения с наборами разных фирм и производителей. Наше мнение – у каждого метода, набора, протокола – есть своя задача и свой потребитель. При выборе метода и конкретного набора нужно руководствоваться целесообразностью. Часто для отдельных задач вполне достаточно «классических» методов выделения. За последнее время многое из этих «классических» методов существенно улучшены. Эти методы легко отыскать в интернете, ограничив поиск последними годами.

Наборы хороши в тех случаях, когда требуется строгая стандартизация и воспроизводимость. При выборе набора всегда следует помнить, что идеального набора нет. Набор должен выполнять конкретную поставленную задачу, но не надо рассчитывать, что один набор решит все задачи.

Универсальных методов, как и наборов, не существует. Выделение ДНК отличается от выделения РНК, даже когда кажется, что принцип метода похож или одинаков. В результате – разный конечный выход и качество.

Когда появляется новый метод, набор, способ, протокол, возникает ощущение, что это всегда лучше. Увы, это не так. Часто, новый вариант старого метода — это маркетинговый ход, чтобы привлечь внимание к новому продукту. Каждый метод, реализованный в виде набора, имеет четкие критерии для оценки: чистота выделяемой ДНК и РНК, получаемое количество и далее по списку. Не видитесь на рекламу, выбирайте по задачам.

Литература

1. Dahm R, Friedrich Miescher and the discovery of DNA. *Dev Biol.* 2005;278(2):274–288.
2. Holmes FL. Meselson, Stahl, and the Replication of DNA: A History of the Most Beautiful Experiment in Biology. New Haven, CT: Yale University Press; 2001.
3. Meselson M, Stahl FW. The replication of DNA in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1958;44(7):671–682.
4. Tan SC, Yip BC. DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present. *J Biomed Biotechnol.* 2009;2009:574398.
5. V. Glisin, R. Crkvenja, C. Byus, Ribonucleic-Acid Isolated by Cesium-Chloride Centrifugation, *547 Biochemistry*, 13 (1974) 2633-2637.

6. S. Linchao, H. Bremer, Effect of the Bacterial-Growth Rate on Replication Control of Plasmid 549 Pbr322 in Escherichia-Coli, *Molecular & General Genetics*, 203 (1986) 143-149.
7. W.P. Donovan, S.R. Kushner, Polynucleotide Phosphorylase and Ribonuclease-ii Are Required for 551 Cell Viability and Messenger-Rna Turnover in Escherichia-Coli K-12, *P Natl Acad Sci USA*, 83 (1986) 552 120-124.
8. <https://www.future-science.com/doi/pdf/10.2144/000113959>
9. Chomczynski, P. and Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidine thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159.
10. Ulrich A., J Shine, J Chirgwin, R Pictet, E Tischer, W J Rutter, H M Goodman et al. *Science*. 1977 Jun 17;196 (4296): 1313-9.
11. Chirgwin, J.J., Przbyla, A.E., MacDonald, R.J., and Rutter, W.J. 1979. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18:5294.
12. Chomczynski, P. 1989. Product and process for isolating RNA. U.S. Patent #4,843,155.
13. Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*. 1991;10(4):506–513.