

# Сбор и хранение образцов, выделение ДНК.

Прикладная генетика для зоологов, лекция 2

Мюге Н.С.

## Лекция 2.

---

- ▶ Сбор и хранение образцов для генетического анализа. Способы фиксации. Хранение образцов для генетического анализа.
- ▶ Выделение ДНК из различных организмов и тканей. Классический фенольный, солевой, щелочной, абсорбция на стекле и др. носителях, колонки.
- ▶ Оценка качества выделения на СФ и сохранности ДНК (электрофорез).



# Сбор материала для генетического анализа

---

- ▶ Первичная фиксация (обычно 96% этанолом).
- ▶ Если зверь большой, берется образец живой ткани в спирт, остальное – как об. Зоологический материал (формалин, 70% спирт)
- ▶ Этикетка на месте, с соотнесением всего зверя и образца, вкладывается в обе пробирки
- ▶ Протокол сбора в полевом дневнике (дата, место, вид, сборщик, что взято куда)





# сбор и первичная фиксация

---

- ▶ 1. в 96%спирте
- ▶ 2. высушивание (быстрое)
- ▶ 3. DMSO 20% + EDTA
- ▶ 4. соль ?
- ▶ 5. RNALATER
- ▶ 6. замораживание



# Этикетирование

---

- ▶ карандаш по бумаге и по матовому пластику.
- ▶ ручка Uni-Ball UB-157 (спирто-нерастворимая)
- ▶ paint marker (Edding 751 и тоньше)
- ▶ лазерный принтер на обычной бумаге (не на кальке и не мелованной).



# DMSO для фиксации образцов (без спирта!)

---

- ▶ 0.25M EDTA pH 7.5
- ▶ 20% DMSO
- ▶ NaCl saturated
  
- ▶ 1. Measure out 23.265g of EDTA disodium salt with FW 372.24 for a 250ml solution. (This may be different depending on the FW of your EDTA salt). Add 50ml of deionized water to the EDTA salt and stir.
- ▶ \*\*Make sure to sure EDTA disodium salt otherwise more NaOH is needed to pH the EDTA.
- ▶ 2. Make 1M NaOH to pH the EDTA. The EDTA should be around a pH of 3 or 4 to begin with. It will take roughly 50ml of the 1M NaOH to pH the EDTA to 7.5. The EDTA will then begin to dissolve slowly. Be patient. Heating to 30°C helps.
- ▶ 3. Once all the EDTA salt is dissolved bring the volume up to 200ml with deionized water. Then add the 20% DMSO, which is 50ml for a 250ml solution. Return to a beaker and stir for a few minutes.
- ▶ 4. Add NaCl until it no longer dissolves. Pour the solution into a bottle leaving most of the salt crystals in the beaker.



# Хранение ?

---

*Molecular Marine Biology and Biotechnology* (1998) 7(2), 145–152

## Field preservation of marine invertebrate tissue for DNA analyses

- ▶ RT
- ▶ +4C
- ▶ -20C
- ▶ -80C

Mike N Dawson\*, Kevin A. Raskoff, and David K. Jacobs

*Department of Biology, UCLA, P.O. Box 951606, Los Angeles, California 90095-1606, U.S.A.*

### Abstract

Successful preservation of tissue samples is a prerequisite for long field studies in remote areas. However, there is little published information con-

mendations on how best to preserve marine invertebrate tissues for DNA analyses. This as a significant omission for several reasons. First, DNA analyses are invaluable in studies of the evolution, systematics, and population genetics of marine invertebrates (e.g., see McMillan et al., 1991; Avise, 1994, p. 154; Burton and Lee, 1994; Palumbi, 1994; France et al., 1996). Second, marine invertebrates are becoming increasingly important to the pharmaceutical industry (Colin and Arneson, 1995). Fi-

**Вывод: Оптимальное длительное хранение образцов – в 96%этаноле на –20C - -70C**

---

▶ ine the effect of five storage solutions and three temperature regimens on the degradation of DNA from four common classes of marine invertebrates (Anthozoa, Gastropoda, Polychaeta, and Scypho-

DNA is particularly susceptible to degradation by hydrolytic and oxidative endogenous nucleases (Dessauer et al., 1995), which, if not countered, break down highly informative long strands of



# в лаборатории:

---

- ▶ 1. перезаливка свежим спиртом (96%)
- ▶ 2. этикетирование (добавление к временной этикетке постоянной)
- ▶ 3. Проверка и упорядочивание протоколов сбора. Соотнесение с образцом в музейной коллекции (voucher specimen)



# Экстракция ДНК

---

- ▶ **Стандартный: фенол-хлороформ**

классический. хорошая депронизация, но: много пробирок и носов, трудоемко, требует тяги или лояльного отношения коллег к запаху фенола.

- ▶ **Солевой (NaCl), Ajanabi**

Две пробирки, дешевые реагенты, не ко всему подходит

- ▶ **Адсорбция на стекле (glassmilk) или магнитных частицах**

Быстро, удобно, требует ОЧЕНЬ хорошей отмывки

- ▶ **Абсорбция на колонках**

дорого, но «фирменно»



# Экстракция ДНК

---

- ▶ **Chelix**

NI в криминалистике – образец получается сразу, но не хранится

- ▶ **Щелочной**

Лизис посредством КОН

- ▶ **Кипячение**

Один зверь – одна реакция, для совсем мелких



# Фенольный метод выделения ДНК

---

- ▶ 1. Лизис с Proteinase K
- ▶ 2. Экстракция с фенолом (pH>7,8!)
- ▶ 3. Экстракция с PCI (phenol-chlorophorm-isoamilalcohol (25:24:1))
- ▶ 4 Экстракция с CI
- ▶ Осаждение спиртом



# Подготовка фенола

---

- ▶ Хранить чистый фенол на  $-20^{\circ}\text{C}$
- ▶ Смешать с 1 объемом  $0.5\text{M}$  Tris-HCl,  $\text{pH}=8$ , перемешать, открутить, слить буфер
- ▶ Смешать с 1 объемом  $0.1\text{M}$  Tris-HCl,  $\text{pH}=8$ , перемешать, открутить, слить буфер
- ▶ Довести  $\text{pH}$  до 8 (капая на лакмусовую бумагу)
- ▶ Хранить под буфером на  $+4^{\circ}\text{C}$



# Лизисный буфер (хранить при 4°C)

DB digestion buffer (хранить при 4°C):				
	Конц.	Сток	50ml	100ml
NaCl	0.1M	5M	1.0ml	2.0ml
Tris Cl, pH 8.0	10mM	1M	0.5ml	1.0ml
EDTA	25mM	0.5M	2.5ml	5.0ml
SDS	0.5%	10%	2.5ml	5.0ml
Proteinase K*	0.1 mg/ml	<u>ТВ.</u> 20mg/ml	<u>5mg</u> 250µl	<u>10mg</u> 0.5ml
H <sub>2</sub> O		mQ	43.5ml	87ml

\* - перед использованием.

# Осаждение ДНК спиртами

---

- ▶ Высокая ионная сила раствора (одновалентные катионы:

$\text{AcNH}_4 \Rightarrow 2.0\text{M}$

$\text{LiCl} \Rightarrow 0.8\text{M}$

$\text{NaCl} \Rightarrow 0.2\text{M}$

$\text{AcONa} \Rightarrow 0.3\text{M};$

- ▶ + 2.5V 96% EtOH или 1V Изопропанола

*если требуется добавить какой-либо соосадитель (линейный PAA, tRNA, гликоген.*

Осаждение улучшается, если добавить  $\text{MgCl}_2$  до 10mM. (molbiol.ru)

- ▶ Перемешать, охладить, открутить, слить
- ▶ Промыть 70% этанолом (2 раза)
- ▶ Подсушить спирт с осадка, растворить в TE или воде



# Протокол выделения ДНК по Aljanabi SM, Martinez I.

---

1. Гомогенизировать свежую ткань в 400 мкл стерильного буфера для гомогенизации:

0.4 M NaCl

10 mM Tris-HCl pH 8.0

2 mM EDTA pH 8.0

в гомогенизаторе 10 – 15 сек.

2. + 40 мкл 20 % SDS (2 % конечная концентрация) и 8 мкл 20 мг/мл протеиназы K (400 мкг/мл конечная концентрация), хорошо перемешать, инкубировать 55 – 65 °C как мин. 1 час или на ночь.

3. + 300 мкл 6 M NaCl (насыщенный р-р)

4. Перемешать на вортексе с максимальной скоростью 30 сек

5. Центрифугировать 30 мин 10 000 g

6. Супернатант перенести в новый эппендорф

7. + Равный объем изопропанола, хорошо перемешать, инкубировать -20° C 1 час.

8. Центрифугировать 20 мин при 4 ° C 10 000 g

9. Сполоснуть осадок 70 %-ым этанолом, высушить и ресуспендировать в 300 – 500 мкл стер. дист. воды.

Ориентировочно – около 3 часов (с поправкой на шаг 2).

Nucleic Acids Research, 1997, Vol.25, No 22, 4692 – 4693

---





# Осаждение СТАВ

---

- ▶ DNA + СТАВ (из 5% стока) до 0.25-1.4%;
- ▶ 2'-ОН NT;
- ▶ ЦФ 10'.
- ▶ растворить в буфере с высокой ионной силой, переосадить спиртом.
  
- ▶ СТАВ (Cetrimide  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}(\text{CH}_3)_3\text{Br}$ ,  $M_w=364.5$ )
- ▶ СТАВ — сильный детергент. Он эффективно разрушает ДНК — белковые комплексы. Комплекс нуклеиновых кислот с СТАВ растворим только в высокой соли (2M LiCl, 1M NaCl). Для очистки нуклеиновых кислот раствор нуклеиновых кислот в 1.5M NaCl, 2% СТАВ можно экстрагировать хлороформом. СТАВ образует нерастворимый комплекс с DNA при концентрации соли ниже, чем 0.5M (выпадает в осадок при добавлении 2-2.5V EtOH или 0.7V изопропанола). Полисахариды, мембраны, фенолы и т. п. при этом не осаждаются. После осаждения, для очистки от остатков СТАВ требуется переосаждение, осадок лучше сполоснуть 80% спиртом (СТАВ в нём растворим).
- ▶ [http://www.molbiol.ru/protocol/09\\_02.html](http://www.molbiol.ru/protocol/09_02.html)



# ▶ **Протокол выделения ДНК Гаджиевским набором**

1. Приготовление рабочего раствора **солевого буфера**. **10Мл 10-кратного солевого буфера перенести в цилиндр, довести бидистиллированной водой до метки 100мл** и 96% этиловым спиртом до метки 300мл и перемешать. Хранить при 4°C.
2. В пробирку объемом 1.5мл внести 100мкл исследуемой пробы, добавить 400мкл **Лизирующего реагента** и перемешать **переворачиванием 5-10 раз. Не встряхивать.**
3. Термостатировать пробирку со смесью 5-7 минут при 65°C (30-40 минут при выделении из сухого материала).
4. Если смесь содержит нерастворившиеся элементы центрифугировать 10сек при 5000g. Прозрачный супернатант перенести в чистую пробирку.
5. В пробирку с чистой смесью добавить 20мкл суспензии сорбента **NucleoS™** (перед использованием **NucleoS™ интенсивно встряхнуть на вортексе**).
6. Пробирку перемешивать на ротаторе 10мин.
7. Центрифугировать 10сек при 5000g.
8. Осторожно удалить супернатант с помощью водоструйного насоса.
9. К осадку добавить 200мкл **Лизирующего реагента** и **тщательно перемешать на вортексе**.
10. Добавить в пробирку 1мл **солевого буфера** и **перемешать переворачиванием 5-10раз**.
11. Центрифугировать 10сек при 5000g.
12. Осторожно удалить супернатант с помощью водоструйного насоса.
13. Добавить в пробирку 1мл **солевого буфера**, **перемешать на вортексе** центрифугировать 10сек при 5000g и осторожно удалить супернатант с помощью водоструйного насоса.
14. Добавить в пробирку 1мл **солевого буфера**, **перемешать на вортексе** центрифугировать 10сек при 5000g и осторожно удалить супернатант с помощью водоструйного насоса.
15. Просушить осадок при 65°C.
16. Внести в пробирку 50мл **ЭкстраГена™ (100мкл если выделение производится из богатой ДНК пробы)**. **ЭкстраГен™ следует отбирать из общего объема при** постоянном перемешивании.
17. Суспендировать содержимое пробирки на вортексе до получения гомогенной суспензии. Термостатировать 4-5мин при 65°C.
18. Центрифугировать 1мин при 10000g.
19. Перенести водный раствор (с ДНК) в новую пробирку.

# Worm lysis buffer

---

No	Chemicals	F.W.	Stock	Final	1 ml	2 ml	5 ml
1	KCl (Sigma, P-9541)	74.56g	1M	50 mM	50 $\mu$ l	100 $\mu$ l	250 $\mu$ l
2	Gelatin* (Dicto Bacto, 0143-02 ¼ lb)		1%	0.05 %	50 $\mu$ l	100 $\mu$ l	250 $\mu$ l
3	Tris pH 8.2 (BioRad, 161-0719)	121.14g	1M	10 mM	10 $\mu$ l	20 $\mu$ l	50 $\mu$ l
4	Tween 20 (Fisher, FL-04-0796)	1227.54 g	100%	0.45 %	4.5 $\mu$ l	9 $\mu$ l	22.5 $\mu$ l
5	Proteinase K (Roche, 0092 766, 1gm)		20mg/ml	60 $\mu$ g/ml	3.3 $\mu$ l	6.6 $\mu$ l	16.5 $\mu$ l
6	MgCl <sub>2</sub> (From PCR reagents)	95.21g	1M	2.5 mM	2.5 $\mu$ l	5 $\mu$ l	12.5 $\mu$ l
7	ddH <sub>2</sub> O				880 $\mu$ l	1760 $\mu$ l	4400 $\mu$ l



---

## A. WLB (Worm lysis buffer): after Williams et al., 1994 Genetics 131:60

### WLB (Worm lysis buffer):

(\*: made fresh, 100mg gelatin in 10ml water and heat in microwave)

#### 1. *Many worms*

1. Add 50  $\mu$ l lysis buffer to tissue sample (approximately 0.5 cm) in a 0.5 ml PCR tube.
2. Place at  $-70^{\circ}\text{C}$  > 15min. Can store for several days. Or put in liquid nitrogen to  $55^{\circ}\text{C}$  water bath for 10 times to help break down the nematode body.
3. Warm to room temperature and add 1 drop mineral oil.
4. Incubate at  $60^{\circ}\text{C}$  > 1 hour. Vortex at least once during incubation to help breakup tissue.
5. Heat to  $95^{\circ}\text{C}$  for 15 min. (Kills off Proteinase K).
6. Cool to  $4^{\circ}\text{C}$ .
7. Vortex briefly (2-3 sec).
8. Spin at 6,000 rpm for 30 sec.
9. Use 1  $\mu$ l supernatant as template for PCR amplification for 25  $\mu$ l reaction.

#### 2. *Nematodes-for single worm*

1. Add 15  $\mu$ l lysis buffer to worm in a 0.5 ml PCR tube.
  2. Place at  $-70^{\circ}\text{C}$  > 15 minutes. Can store for several days.
  3. Warm sample to room temperature and add mineral oil.
  4. Incubate at  $60^{\circ}\text{C}$  > 1 hour.
- e. Heat to  $95^{\circ}\text{C}$  for 15 minutes
  - f. Cool to  $4^{\circ}\text{C}$ .
  - g. Pipet sample up and down to mix
  - h. Use 2.5  $\mu$ l as template for PCR amplification.



# Сравнение разных методов выделения ДНК из волоса

---

Biol. Chem., Vol. 380, pp. 1329–1331, November 1999 · Copyright © by Walter de Gruyter · Berlin · New York

Short Communication

## An Evaluation of Techniques for the Extraction and Amplification of DNA from Naturally Shed Hairs

Linda Vigilant

Max Planck Institute for Evolutionary Anthropology,  
Inselstr. 22, D-04103 Leipzig, Germany

**Table 1** Comparison of Methods for the Isolation of DNA from Single Hairs.

Method	Time <sup>a</sup>	Success <sup>b</sup> (%)
1. Organic	O/N + 3 h	12/25 (48)
2. Tissue kit	1 h	11/26 (42)
3. Chelex	O/N + 20 min	19/27 (70)
4. Buffer digest	O/N + 20 min	22/26 (85)



# Использование максатазы (и прочих ферментов стиральных порошков) вместо протеиназы К

- ▶ Выбрать синие гранулы в стиральном порошке фирмы Henkel, растворить в воде
- ▶ Добавить в 10мл воды 300мг NaCl, несколько синих гранул, щепотку порошка (детергент) и кусочек исследуемой ткани
- ▶ Поставить на батарею и перемешивать сутки (кусочек ткани должен полностью раствориться)
- ▶ Добавить 30 мл холодного (из морозилки) этанола
- ▶ Накрутить медузу на скрепку
- ▶ Промыть в 70% спирте
- ▶ Растворить в воде
- ▶ Хранить в морозильнике

