

УДК 543.426; 543.9 + 57.087

© О. С. Антонова, Н. А. Корнева, Ю. В. Белов, В. Е. Курочкин

ЭФФЕКТИВНЫЕ МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗОВ В МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ (ОБЗОР)

В настоящем обзоре приведена классификация различных методов выделения нуклеиновых кислот, обсуждаются приоритетные требования, предъявляемые к этим методам, и показаны преимущества применения магнитных частиц. Скомбинированные с буферной системой определенного состава эти частицы позволяют быстро и эффективно выделить нуклеиновые кислоты из грубого клеточного экстракта, избегая стадии центрифугирования. Метод магнитной сепарации позволяет легко автоматизировать весь процесс и выделять нуклеиновые кислоты из больших количеств образцов. Приведены параметры некоторых коммерческих наборов для выделения нуклеиновых кислот из различных типов образцов.

Кл. сл.: пробоподготовка, препараты ДНК и РНК, экстракция, магнитные частицы, ПЦР в реальном времени

ВВЕДЕНИЕ

Выделение ДНК и РНК — важный шаг подготовки проб перед биохимическими и диагностическими процессами. Многие приложения, такие как амплификация, проведение обратной транскрипции, детектирование накопления продуктов амплификации методом ПЦР в реальном времени, клонирование, секвенс, гибридизация, синтез ДНК и т. д., не могут быть выполнены непосредственно на биологических образцах без предварительной очистки нуклеиновых кислот.

Настоящий обзор позволяет ознакомиться с основными методами пробоподготовки и выбрать оптимальный метод в зависимости от поставленных задач [1]. При выборе метода необходимо учитывать приоритет предъявляемых к нему требований, таких как высокий выход нужной нуклеиновой кислоты, быстрота метода, большая пропускная способность или высокое качество продукта (см., например, [2]). 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 [3]. Присутствие загрязняющих веществ, например белков или углеводов, в таких комплексных смесях часто мешает реализовать необходимые реакции и методики.

Методы выделения нуклеиновых кислот можно разделить по основным физическим и биохимическим признакам на следующие классы:

- жидкофазные методы;
- твердофазные методы.

1. ЖИДКОФАЗНЫЕ МЕТОДЫ

1.1. Классические методы выделения

Классические методы выделения нуклеиновых кислот из сложных исходных образцов, таких как кровь или ткани, включают в себя лизис биологического материала детергентами или хаотропными агентами иногда в присутствии разрушающих белки ферментов. После этого этапа следуют несколько стадий, в которых используются органические растворители, такие как фенол и/или хлороформ или этанол. Полное отделение белков от нуклеиновых кислот может быть достигнуто добавлением перхлората натрия [4]. Для отделения РНК от ДНК необходимо селективное инкубирование с хлоридом лития или специфичное безнуклеазное изолирование с гуанидин хлоридом или гуанидин тиоцианатом, скомбинированное с фенольной экстракцией или этанольной преципитацией [5]. Такие методы увеличивают вероятность деградации нуклеиновых кислот, потери образца или кросс-контаминации образцов, если несколько проб обрабатываются одновременно. При выделении РНК очень велик риск контаминации со стороны присутствующей в исходном образце ДНК.

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 [6]. Однако этот ме-

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

1.2. Методы, позволяющие выделить ДНК и РНК одновременно

Известны методы, согласно которым можно выделить одновременно и ДНК, и РНК из одного источника (см., например, [11]). Большинство известных методов является модификацией оригинальной процедуры Chirgwin с соавторами [12]. При этом используются сильные хаотропные агенты, такие как гуанидин тиоцианат и цезия трифлуороацетат для одновременного разрушения клеточных мембран и инактивации внутриклеточных рибонуклеаз (РНКаза). Лимитирующими факторами таких методик являются необходимость ультрацентрифугирования и большое время анализа (16–44 ч) [13, 14].

Методы одновременного выделения ДНК и РНК, в которых не присутствует операция центрифугирования, имеют преимущество еще и потому, что фенол действует как эффективный депротеинизирующий агент, разрушающий клетки и денатурирующий белки [6, 15]. Для эффективного отделения высокомолекулярной ДНК от РНК сначала производится фенольная экстракция, а затем две фенол-хлороформные экстракции для одновременного удаления белков и липидов из раствора, содержащего нуклеиновые кислоты. С целью повышения выхода нуклеиновых кислот оптимизированы компоненты экстрагирующего буфера [16]. Например, определенный pH буфера (pH 7.9) в присутствии детергента (0.2 % додецилсульфат натрия) и относительно низкая концентрация соли (100 mM LiCl) позволяют эффективно разделять нуклеиновые кислоты в водной фазе и диссоциировать белки. Кроме того, 10 mM ЭДТА не позволяет образовываться белковым комплексам и образует хелатный комплекс с Mg^{2+} , ингибируя, таким образом, действие магний-зависимых нуклеаз [17].

В методе, предложенном Krieg с соавторами [18], для отделения высокомолекулярной ДНК достаточно лизиса и процедуры экстракции с использованием последующей этанольной преципитации. Время, необходимое для выделения валовых клеточных РНК и ДНК, составляет примерно 2 ч.

2. ТВЕРДОФАЗНЫЕ МЕТОДЫ

2.1. Основные принципы твердофазных методов

В твердофазных методах выделения нуклеино-

вых кислот используются следующие процессы и принципы:

а) водородные связи с немодифицированной гидрофильной матрицей, обычно кварцем, в хаотропных условиях;

б) ионообмен в водном растворе, обычно с использованием анионообменников;

в) аффинность;

г) механизмы исключения по размеру.

Твердофазные системы, адсорбирующие нуклеиновые кислоты, — это частицы на основе кварца [7], стеклянные волокна, анионообменные носители [8], которые используются в хроматографических сепарационных колонках. Эти носители применяются для выделения или очистки нуклеиновых кислот с высококонцентрированными растворами хаотропных солей (йодид натрия, перхлорат натрия, гуанидин тиоцианата). Описано применение диатомовой земли в качестве сорбента, в этом случае связывание также происходит в присутствии хаотропной соли. Другие методы основаны на совместной детергенции с материалами, связывающими нуклеиновые кислоты, или на использовании твердого сорбента со связывающими нуклеиновые кислоты функциональными группами в сочетании с полиэтиленгликанами и солями в высокой концентрации.

Известна группа методов пробоподготовки, основанная на использовании ионообменников типа Chelex, сорбирующих примеси, мешающие ПЦР [10]. Однако эти методы в большинстве случаев не могут удалить все возможные примеси, поэтому их применение довольно ограничено.

2.2. Метод выделения нуклеиновых кислот на стекле

Крайне удобным является метод выделения нуклеиновых кислот, предложенный Voort с соавторами [9]. Этот метод включает в себя стадию лизиса клеток сильным хаотропным агентом, который разрушает клеточные мембраны и инактивирует внутриклеточные РНКазы, и последующую сорбцию нуклеиновой кислоты на носителе (стеклянные бусы, диатомовая земля, стеклянное "молоко" и т. д.). Нуклеиновая кислота обратимо связывается со стеклом в присутствии высокой концентрации хаотропных солей (например, гуанидин хлорида, гуанидин тиоцианата). В таких условиях связывания белков с матрицей не происходит. Хаотропные соединения представляют собой вещества, нарушающие упорядоченную структуру воды и тем самым приводящие мембраны в состояние хаоса (например, мочевины, йодид натрия). Таким образом, помимо связывания, хаотропные агенты обеспечивают разрушение клеточных мембран и лизис клеток с последующим выходом нуклеиновой кислоты. Примеси отмыва-

ются хаотропной солью, а хаотропная соль — 80 % этанолом. 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 и Promega). Методы, эксплуатирующие эти колонки, включают стадии центрифугирования или вакуумирования, однако занимают порядка 15 мин.

Табл. 1. Магнитные частицы, используемые для выделения ДНК, РНК и плазмидной ДНК [27]

Продукт	Диаметр (мкм)	Полимерный состав / модификация поверхности	Площадь поверхности ($\text{м}^2\text{г}^{-1}$)	Вид нуклеиновой кислоты	Производитель
AGOWA® mag	5–10	Н. д.	Н. д.	ДНК, РНК	AGOWA, Германия
Dynabeads® DNA	1.05, 2.80	Полистирол	1–10	ДНК	Dynal, Норвегия (переименована в Invitrogen)
GenoPrep™ DNA magnetic beads	Н. д.	Поверхность, покрытая кварцем	Н. д.	ДНК	GenoVision, Норвегия (Qiagen Company)
MagaZorb®	1–10	Целлюлоза	Пористая	ДНК/РНК, пДНК	Cortex Biochem San Leandro, США
MagneSil	5–8.5	Силанизация оксида железа	27	ДНК/РНК, пДНК	Promega, США
MagPrep® Silica particles	~1	Силанизация оксида железа	14–25	ДНК	Merck KgaA, Германия
MagSi	1, 2, 5	Н. д.	Н. д.	ДНК/РНК	MagnaMedics, Германия
MGP	Н. д.	Стеклянная оболочка без пор	Не пористая	ДНК/РНК	Roche Diagnostic
M-PVA	0.5–1, 1–3, 5–8	Поливиниловый спирт	Не пористая	ДНК/РНК, пДНК	Chemagen Biopolymer Technology, Германия
Sicastar®-M	1.5, 6	Сополимер стирола и малеиновой кислоты	Не пористая	ДНК	Micromod Partikel-technologie, Германия
SiMAG	0.5, 0.75, 1	Силанизация оксида железа	100	ДНК/РНК, пДНК	Chemicell, Германия
SPHERO magnetic particles	1–2	Полистирол	Не пористая	ДНК	Spherotech, США

Примечание. Н. д. — нет данных

2.3. Метод на основе магнитной сепарации

Использование магнитных твердых носителей в биохимических и молекулярно биологических процессах имеет много преимуществ по сравнению с немагнитными сепарационными методами. Обычно магнит прикладывается к стенке сосуда, содержащего образец, чтобы частицы агрегировали у стенки сосуда, а остаток образца можно было убрать. Таким способом можно отделять компоненты клеточного лизата, которые ингибируют ДНК-полимеразу и ПЦР-реакцию, например полисахариды, фенольные компоненты, гумус [19].

Для процесса выделения используются магнитные носители с иммобилизованными аффинными лигандами или изготовленные из биополимера, увеличивающего аффинность к нужной нуклеиновой кислоте. Магнитные носители имеются в продаже или могут быть изготовлены в лаборатории. Магнитные частицы производятся из различных синтетических полимеров, биополимеров, пористого стекла или на основе неорганических магнитных материалов, таких как оксид железа с модифицированной поверхностью. Особенно подходят для выделения суперпарамагнитные частицы, которые не взаимодействуют друг с другом в отсутствие магнитного поля. Эти частицы приобретают магнитный момент в сильном магнитном поле, но не сохраняют постоянного магнетизма, когда поле убирают. Если устранены магнитная агрегация и слипание частиц, то в течение реакции достигается суспензирование частиц и единообразная экстракция нуклеиновых кислот.

Для автоматического выделения нуклеиновых кислот используются магнитные частицы со стеклянным покрытием [20]. Нуклеиновая кислота связывается со стеклянной поверхностью, затем связанная с частицами она проходит те же стадии экстракционного процесса, что и в методике Boom: после серии отмывок в пробе остается нуклеиновая кислота, сорбированная на носителе, с которого она легко снимается с помощью элюирующего буфера. Метод удобен, технологичен и пригоден для подготовки образца к амплификации, его можно воспроизвести на роботизированных пипеттирующих рабочих станциях. Однако возможны потери продукта вследствие необратимой сорбции на носителе, а также в процессе многочисленных отмывок. Особенно большое значение это имеет при работе с небольшими количествами ДНК в образце [21].

Валовые ДНК и РНК выделяются с помощью одних и тех же магнитных частиц. Чтобы отделить РНК от ДНК, РНК уничтожается до стадии сепарации ДНК. Наилучшим вариантом является добавление РНКазы или щелочи. Наоборот, РНК может быть выделена при разрушении ДНК дезоксирибонуклеазой (ДНКазой).

Например, первичный метод очистки плазмиды — отделение плазмидной ДНК (пДНК) от хромосомной ДНК и клеточной РНК бактерии-хозяина. Stadler с соавторами [22] показали, что даже в случае многокопийной плазмиды пДНК составляет не более 3 % клеточного лизата и большинство контаминантов заряжены отрицательно (РНК, комплементарная ДНК (кДНК), эндотоксин), сходны по размеру (кДНК, эндотоксин) и по гидрофобности (эндотоксин). Были разработаны методы для наработки очищенного лизата, но они не способны убрать белки и липиды. Также возможен щелочной лизис бактериальных клеток с последующей нейтрализацией [23]. Протоколы очистки лизатов отличаются друг от друга концентрациями солей, объемами, рН, температурой, продолжительностью стадий. Эти методы эксплуатируют разницу в характеристиках ковалентной закрытой кольцевой пДНК и фрагментов хромосомной ДНК при денатурации и ренатурации [24]. Например, суперпарамагнитные частицы, модифицированные мультивалентным катионным полиэтиленимином, используются для выделения пДНК из очищенного бактериального лизата [25].

Доступны различные магнитные частицы с оптимизированными буферами и протоколами для лабораторий и автоматических систем (табл. 1 и 2). Обычно к магнитным носителям прилагаются связывающие растворы, с помощью которых осуществляется селективное связывание нуклеиновых кислот. Например, для связывания вирусных нуклеиновых кислот можно использовать как вирусные белки, так и комплементарные ДНК- или РНК-последовательности [26].

В табл. 2 приведены некоторые магнитные частицы с иммобилизованным на их поверхности олигодеокситимидином для эффективного и быстрого выделения высокоочищенной матричной РНК (мРНК) из культур эукариотических клеток или выделения валовой РНК [28]. Метод выделения основан на гибридизации последовательности олигодеокситимидина стабильным полиаденилированным 3-концом эукариотической мРНК. Длина комплементарной последовательности — 20–30 олигонуклеотидов. Эта последовательность либо напрямую ковалентно связывается с поверхностью частицы, либо не напрямую, через биотинилированные олигонуклеотиды, и с помощью взаимодействия между покрытыми стрептавидином частицами. Корпорации CPG и Dynal (в настоящее время Invitrogen) производят MPG® и Dynabeads® с иммобилизованными биотинилированными олигонуклеотидами, однако и другие фирмы предлагают модифицированные стрептавидином частицы, которые могут быть использованы для выделения мРНК, как описывается, например, в инструкции к "mRNA isolation kit with MagneSphere®" фирмы Promega. Почти все магнитные частицы

Табл. 2. Некоторые магнитные частицы, используемые для выделения матричной РНК [27]

Продукт	Диаметр (мкм)	Полимерный состав / модификация поверхности	Площадь поверхности ($\text{м}^2\text{г}^{-1}$)	Производитель
BcMag® mRNA	1, 5	Силанизация оксида железа	Н. д.	Bioclone, США
BioMag® oligo(dT)20	1	Силанизация оксида железа	100	Bangs Lab., Fisher, США, или Polysciences, США
Dynabeads® oligo(dT)25	1.05, 2.8	Полистирол	1–10	Dynal, Норвегия (переименована в Invitrogen)
µMACS oligodT	0.05	Декстран	Не пористая	Miltenyi Biotech, Германия
MagaCell™ oligodT30	1–10	Целлюлоза	Пористая	Cortex Biochem, США
MagneSphere®	1	Покрытый стрептавидином магнетит	100–150	Promega, США
MPG® streptavidin oligo(dT)25	5	Пористое боросиликатное стекло	60	PureBiotech, США
M-PVA-oligo(dT)30	Различный (0.5–1; 1–3; 5–8)	Поливиниловый спирт	Не пористая	Chemagen AG, Германия
mRNA-cellulose	1–10	Целлюлоза	Н. д.	Scipac Ltd., Великобритания
Nucleo-Adembeads	0.1–0.5	Полимеры	100	Ademtech, Франция
Scigen M100 oligo(dT)30	~3.5	Целлюлоза	10	Vector Lab., США
Sera-Mag oligo(dT)30	1	Полистирол	Не пористая	Seradyn, С

Примечание. Н. д. — нет данных

(кроме MagaCell™ oligodT30 и Sera-Mag oligo(dT)30) продаются вместе с оптимизированными буферными системами и готовыми протоколами. Число производителей магнитных частиц постоянно растет, поэтому для поставленной задачи легко подобрать удобный метод.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате изучения цитируемых в этом обзоре литературных источников установлены приоритетные требования, которые должны обеспечивать методы выделения ДНК или РНК:

- 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.

Некоторые автоматизированные приборы с использованием магнитных частиц уже применяются для подготовки образцов в лабораториях. В Институте аналитического приборостроения РАН разработан макет автоматического прибора для выделения ДНК. Метод, положенный в основу данного устройства, получил условное название

метода магнитной ротации. Сепарация частиц из раствора осуществляется на намагниченных стержнях, опущенных в раствор. Отделение магнитных частиц с сорбированными на их поверхности нуклеиновыми кислотами происходит после помещения стержней в реакционную смесь и их намагничивания. Перенос магнитных частиц в пробирку со следующим по протоколу реагентом или раствором осуществляется намагниченными стержнями. После помещения стержней в соответствующую жидкость и размагничивания их вращают для равномерного перемешивания суспензии магнитных частиц и прочих компонентов. Подобный принцип построения устройства позволяет достичь высокого качества очистки и не допустить загрязнения предыдущим промывочным раствором следующего раствора. Результаты испытаний макета автоматического прибора для выделения ДНК количественно оценены при помощи известного серийного анализатора нуклеиновых кислот АНК-32 [29].

В настоящее время разработан ряд импортных приборов для выделения нуклеиновых кислот в автоматическом режиме, например BioRobot EZ1 (QIAGEN) и MagNA Pure LC instrument (Roche). Ведется подготовка следующего обзора, в котором будут рассмотрены эти и другие автоматические приборы для выделения ДНК, а также методики их применения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Basic DNA and RNA Protocols, Methods in Molecular Biology. V. 58 / Harwood A.J. (editor). New Jersey: Humana Press, Totowa, 1994. P. 3–7.
2. Klintschar M., Neuhofer F. Evaluation of an Alkaline Lysis Method for the Extraction of DNA from Whole Blood and Forensic Stains for STR Analysis // J. Forensic Sci. 2000. V. 45. P. 669–673.
3. Moss D., Harbison S.A., Saul D.J. An Easily Automated, Closed-Tube Forensic DNA Extraction Procedure Using a Thermostable Proteinase // Int. J. Legal Med. 2003. V. 117. P. 340–349.
4. Wilcockson J. The Use of Sodium Perchlorate in Deproteinization During the Preparation of Nucleic Acids // Biochem. J. 1973. V. 135. P. 559–561.
5. Bowtell D.D. Rapid Isolation of Eukaryotic DNA // Anal. Biochem. 1987. V. 162. P. 463–465.
6. Graham D.E. The Isolation of High Molecular Weight DNA from Whole Organisms or Large Tissue Masses // Anal. Biochem. 1978. V. 85, N 2. P. 609–613.
7. Breadmore M.C., Wolfe K.A., Arcibal I.G., et al. Microchip-Based Purification of DNA from Biological Samples // Anal. Chem. 2003. V. 75. P. 1880–1886.
8. Teeters M.A., Conrardy S.E., Thomas B.L., et al. Adsorptive Membrane Chromatography for Purification of Plasmid DNA // J. Chromatogr. A. 2003. V. 989. P. 165–173.
9. Boom R., Sol C.J., Salimans M.M., et al. Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids // J. Clin. Microbiol. 1990. V. 28. P. 495–503.
10. Walsh P.S., Metzger D.A., Higuchi R. Chelex 100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR-Based Typing from Forensic material // Biotechniques. 1991. V. 10, N 4. P. 506–513.
11. Coombs L.M., Pigott D., Proctor A., et al. Simultaneous Isolation of DNA, RNA and Antigenic Protein Exhibiting Kinase Activity from Small Tumour Samples Using Guanidine Isothiocyanate // Anal. Biochem. 1990. V. 188. P. 338–343.
12. Chirgwin J.M., Przybyla A.E., MacDonald R.J., Rutter W.J. Isolation of Biologically Active Ribonucleic Acid from Sources Enriched in Ribonuclease // Biochemistry. 1979. V. 18. P. 5294–5299.
13. Zarlenga D.S., Gamble H.R. Simultaneous Isolation of Preparative Amounts of RNA and DNA from Trichinella Spiralis by Cesium Trifluoroacetate Isopycnic Centrifugation // Anal. Biochem. 1987. V. 162. P. 569–574.
14. Meese E., Blin N. Simultaneous Isolation of High Molecular Weight RNA and DNA from Limited Amounts of Tissues and Cells // Gene Anal. Tech. 1987. V. 4. P. 4549.
15. Raha S., Merante F., Proteau G., Reed J.K. Simultaneous Isolation of Total Cellular RNA and DNA from Tissue Culture Cells Using Phenol and Lithium Chloride // Gene Anal. Tech. 1990. V. 7. P. 173–177.
16. Wallace D.M. Large and Small Scale Phenol Extractions // Methods in Enzymology. Guide to Molecular Cloning Techniques. V. 152 / Eds. Berger S.L. and Kimmel A.R. FL, Orlando: Academic, 1987. P. 33–41.
17. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2nd ed. NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
18. Krieg P., Ammann E., Sauer G. The Simultaneous Extraction of Highmolecular-Weight DNA and of RNA from Solid Tumours // Anal. Biochem. 1983. V. 134. P. 288–294.
19. Demeke T., Adams R.P. The Effects of Plant Polysaccharides and Buffer Additives on PCR // Biotechniques. 1992. V. 12. P. 332–334.
20. Hoorfar J., Cook N., Malorny B., et al. Making Internal Amplification Control Mandatory for Diagnostic PCR // J. Clin. Microbiol. 2003. V. 41. P. 5835.
21. Suffys Ph., Vanderborcht P.R., Barros dos Santos P., et al. Inhibition of the Polymerase Chain Reaction by Sputum Samples from Tuberculosis Patients after Processing Using a Silica-guanidiniumthiocyanate DNA Isolation Procedure // Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2001. V. 96, N 8. P. 1137–1139.
22. Stadler J., Lemmens R., Nyhammar T. Plasmid DNA Purification // J. Gene Med. 2004. V. 6. P. S54–S66.
23. Birnboim H.C., Doly J.A. Rapid Alkaline Extraction

- Procedure for Screening Recombinant Plasmid DNA // *Nucleic Acid. Res.* 1979. V. 7. P. 1513–1523.
24. *Birnboim H.C.* A Rapid Alkaline Extraction Method for the Isolation of Plasmid DNA // *Methods Enzymol.* 1983. V. 100. P. 243–255.
25. *Chiang C.-L., Sung C.-S., Wu T.-F., et al.* Application of Superparamagnetic Nanoparticles in Purification of Plasmid DNA from Bacterial Cells // *J. Chromatogr. B.* 2005. V. 822. P. 54–60.
26. *Satokari R.M., Kataja K., Soderlund H.* Multiplexed Quantification of Bacterial 16S rRNA by Solution Hybridization with Oligonucleotide Probes and Affinity Capture // *Microb. Ecol.* 2005. V. 50. P. 120–127.
27. *Berensmeier S.* Magnetic Particles for the Separation and Purification of Nucleic Acids // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006. V. 73. P. 495–504.
28. *Jacobsen N., Nielsen P.S., Jeffares D.C., et al.* Direct Isolation of Poly(A)(+) RNA from 4 M Guanidine Thiocyanate-Lysed Cell Extracts Using Locked Nucleic Acid-Oligo(T) Capture // *Nucleic Acids Res.* 2004. V. 32. P. e64.
29. *Алексеев Я.И., Белов Ю.В., Варламов Д.А. и др.* Приборы для диагностики биологических объектов на основе метода полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) // *Научное приборостроение.* 2006. Т. 16, № 3. С. 132–136.

**Институт аналитического приборостроения РАН,
Санкт-Петербург**

Контакты: Белов Юрий Васильевич,
Bel3838@mail.ru

Материал поступил в редакцию 28.12.2009.

METHODS OF NUCLEIC ACIDS PURIFICATION AND SEPARATION IN MOLECULAR BIOLOGY (REVIEW)

O. S. Antonova, N. A. Korneva, Yu. V. Belov, V. E. Kurochkin

Institute for Analytical Instrumentation RAS, Saint-Petersburg

This review describes different methods for nucleic acid purification. Recently specifically functionalized magnetic particles were developed and they became an important tool for nucleic acid separation. They are used for the quick and efficient purification of nucleic acids from crude cell extracts avoiding centrifugation steps. Magnetic separation is now used for laboratory automation which is required for processing a large number of samples. Various commercially available magnetic particle-based kits for a variety of different sample materials are listed.

Keywords: DNA/RNA extraction, magnetic particles, real-time PCR