



Методы выделения нуклеиновых кислот. Анализ нуклеиновых кислот.

Спецпрактикум по биохимической генетике - Лекция 2
Старший преподаватель: PhD, Сmekенов Изат Темиргалиевич
Кафедра молекулярной биологии и генетики



ЦЕЛЬ ЛЕКЦИИ

Дать теоретическое и практическое понимание методов выделения, очистки и количественного анализа ДНК и РНК, а также принципов разделения нуклеиновых кислот с помощью агарозного и полиакриламидного гель-электрофореза.

ЗАДАЧИ

- ✓ описать основные этапы выделения ДНК/РНК из биологического материала
- ✓ объяснить разницу между колонночными, фенол-хлороформными и магнитными методами выделения
- ✓ определить концентрацию и чистоту нуклеиновых кислот с помощью спектрофотометрии и флуориметрии
- ✓ выбрать тип геля (агарозный / ПААГ) в зависимости от размера фрагмента
- ✓ проанализировать результаты электрофореза и интерпретировать полосы на геле
- ✓ рассчитать процент агарозы / акриламида под нужный диапазон фрагментов

Ключевые термины

Экстракция ДНК, выделение РНК, лизирующий буфер, хаотропные соли, соотношение A260/A280, флуориметрия, электрофорез в агарозном геле, PAGE (электрофорез в полиакриламидном геле), лестница ДНК, бромистый этидий, SYBR Safe, денатурирующий PAGE.

1. Экстракция ДНК и выделение РНК

- ✓ Основная цель: получить чистые нуклеиновые кислоты для последующих молекулярно-биологических исследований.
- ✓ Используются лизирующие буферы, содержащие детергенты и ионы для разрушения клеточных мембран и ядерной оболочки.
- ✓ Хаотропные соли (например, гуанидиний) помогают денатурировать белки и стабилизировать нуклеиновые кислоты.

2. Оценка чистоты и концентрации

- ✓ Спектрофотометрия: измерение A260/A280 для оценки чистоты ДНК и РНК.
- ✓ Флуорометрия: более чувствительный метод количественного определения нуклеиновых кислот.

3. Электрофорез

- ✓ Агарозный гель: разделение ДНК и РНК по размеру; используется для проверки целостности и оценки размера.
- ✓ Лестница ДНК (DNA ladder) служит для калибровки размеров фрагментов.
- ✓ Красители: бромистый этидий (этд), SYBR Safe — позволяют визуализировать нуклеиновые кислоты под UV или голубым светом.

4. Полиакриламидный гель (PAGE)

1. Используется для разделения коротких нуклеотидов и фрагментов ДНК высокой разрешающей способности.
2. Денатурирующий PAGE применяется для предотвращения образования вторичной структуры нуклеиновых кислот и точного разделения по размеру.

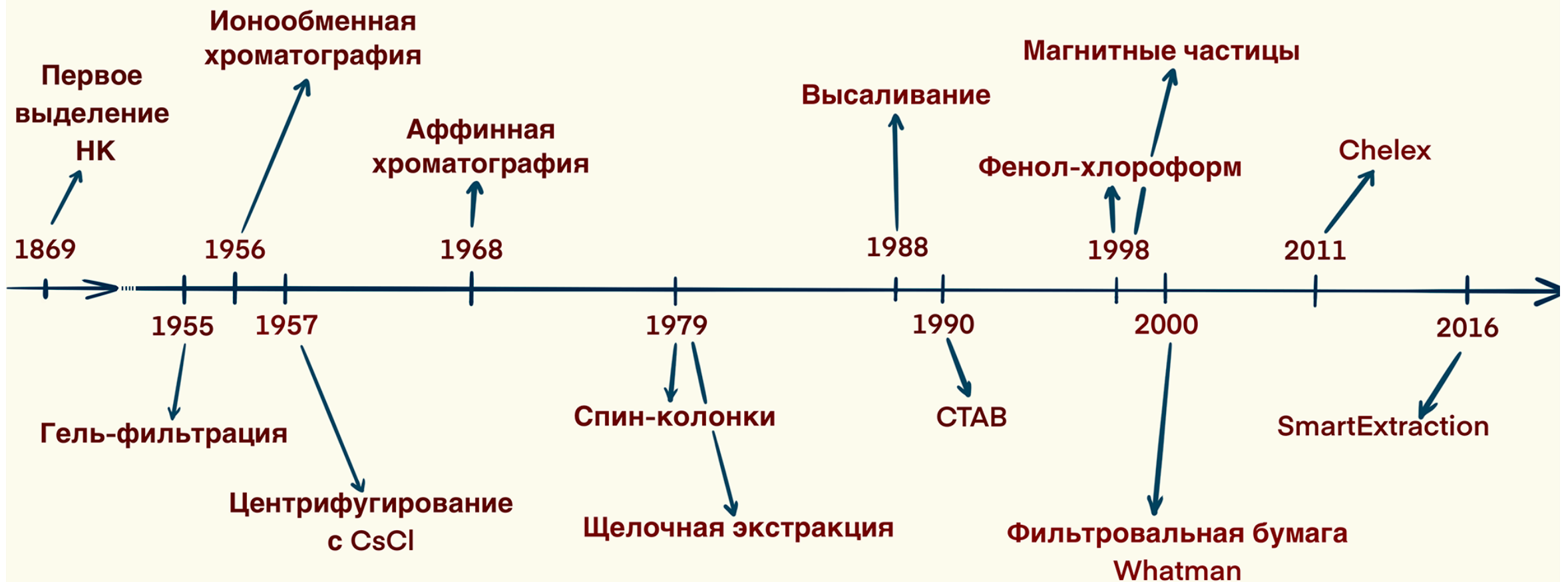


ОСНОВНЫЕ ВОПРОСЫ

- 1) Какие принципы лежат в основе экстракции ДНК и выделения РНК?
- 2) Как действуют лизирующий буфер и хаотропные соли?
- 3) Как оценить чистоту и концентрацию нуклеиновых кислот? В чем разница между спектрофотометрией и флуорометрией?
- 4) Как используется электрофорез в агарозном геле для анализа ДНК и РНК?
- 5) Какую роль играет лестница ДНК в электрофорезе?
- 6) Какие красители применяются для визуализации нуклеиновых кислот и как они действуют?
- 7) В чем преимущество PAGE и денатурирующего PAGE по сравнению с агарозным гелем?
- 8) Как предотвратить деградацию РНК при выделении и анализе?

Выделение нуклеиновых кислот

- Важным этапом при изучении нуклеиновых кислот является их наличие, то есть правильное выделение из клеток.
- к середине XX века были разработаны основные принципы работы с нуклеиновыми кислотами.



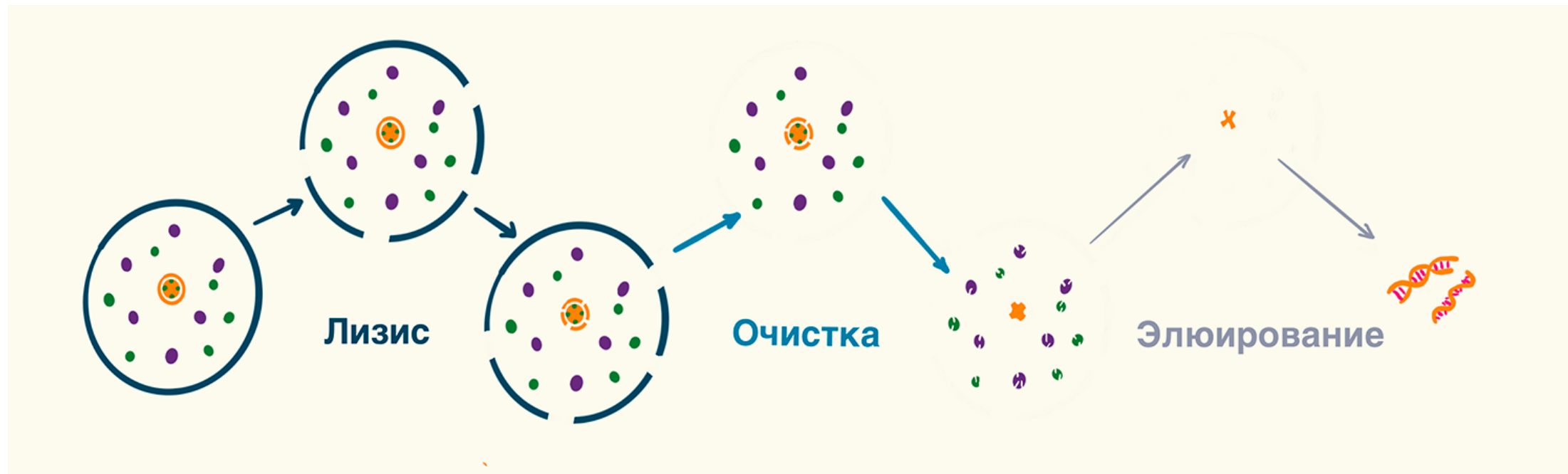
Хронология развития различных методов выделения нуклеиновых кислот

Основные принципы выделения

Цели экспериментов могут быть разными, но все исследователи скорее будут отдавать предпочтение тем методам, которые:

- ✓ Специфичны и подходят под особенности объекта, из тканей которого осуществляется экстракция.
- ✓ Экономичны по времени.
- ✓ Просты и не требуют высокоспециализированного оборудования.
- ✓ Включают в себя использование безопасных реактивов.
- ✓ Могут быть модифицированы под методы, с которыми предстоит дальнейшая работа.
- ✓ Максимально защищены от загрязнения (контаминации).

Выделение нуклеиновых кислот делят на три основных этапа

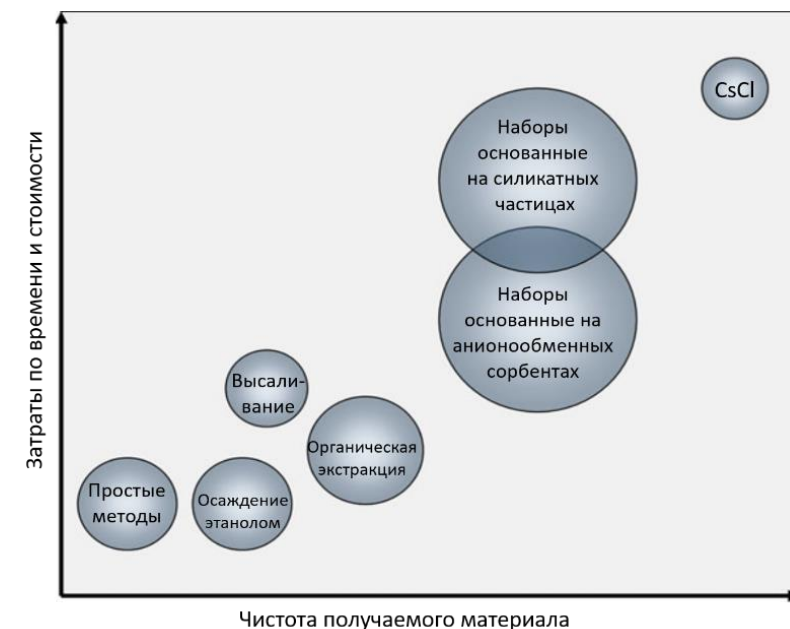


Основные этапы выделения нуклеиновых кислот. Сперва происходит лизис клеточных стенок, а затем и ядерных мембран. После осуществляется деградация белков, в том числе гистонов. Затем нуклеиновые кислоты отделяются от других клеточных компонентов.

❖ **Лизис клеток** — физический или химический. Так, если мы выделяем нуклеиновые кислоты из листьев растения, то сперва необходимо их протереть (физически нарушить целостность клеток), а потом использовать специальный буфер. Возможно, также понадобится нагревание (для ускорения лизиса) или центрифугирование образцов (для разделения на фракции). В качестве химического агента для лизиса используют специальные буферы. Они могут содержать буферные соли (например **Tris-HCl**) и ионные соли (например **NaCl**) для регулирования **pH** и **осмолярности лизата**. Иногда добавляют детергенты (такие как **Triton X-100** или **SDS**), чтобы разрушить клеточную мембрану.

❖ **Очистка.** После разрушения клеточной и ядерной мембран возникает необходимость удалить примеси — другие вещества, из которых состоят клетки. Добавление концентрированного солевого раствора приводит к выпадению осадка, в котором содержатся белки, липиды и сахара. Помним, что если они останутся вместе с ДНК, то изрядно навредят при ПЦР и/или секвенировании. Нуклеиновые кислоты остаются в растворе, лучшему отделению их от осадка способствует центрифугирование. Удалению белков также помогает добавление протеазы, которая их расщепляет и позволяет отделять от нуклеиновых кислот. Так можно избавиться, например, от белков-гистонов, на которые «намотана» ДНК в хромосомах.

❖ **Элюирование.** Теперь нуклеиновые кислоты необходимо удалить из раствора. Тут пригодится знание химических свойств интересующих нас кислот — они растворимы в воде, но не в спирте. Выходит, стоит нам добавить этанол или изопропиловый спирт, как появится осадок — это наша ДНК (или РНК). Осадок можно отделить от раствора при помощи центрифугирования. После удаляем спирт, и готово.



Основные реагенты для выделения

В основе разных методов выделения лежат три базовых принципа, но это не всё, что их объединяет. Многие подходы схожи еще и составом «действующих лиц». Вот наиболее часто встречающиеся:

- **трис-буфер** — контролирует pH, взаимодействует с липополисахаридами и повышает проницаемость, а также лизирует клеточную мембрану;
- **ЭДТА** — работает как хелатирующий агент, блокируя потребность в кофакторе фермента ДНКазы, тем самым предотвращая деградацию ДНК;
- **SDS** — солюбилизирует белки ядерных и клеточных мембран;
- **NaCl** — нейтрализует отрицательный заряд ДНК, стабилизирует молекулу;
- **MgCl₂** — агент, который защищает и стабилизирует ДНК, блокируя отрицательный заряд липопротеидов;
- **фенол** — осаждает белковые примеси.



Методы выделения нуклеиновых кислот

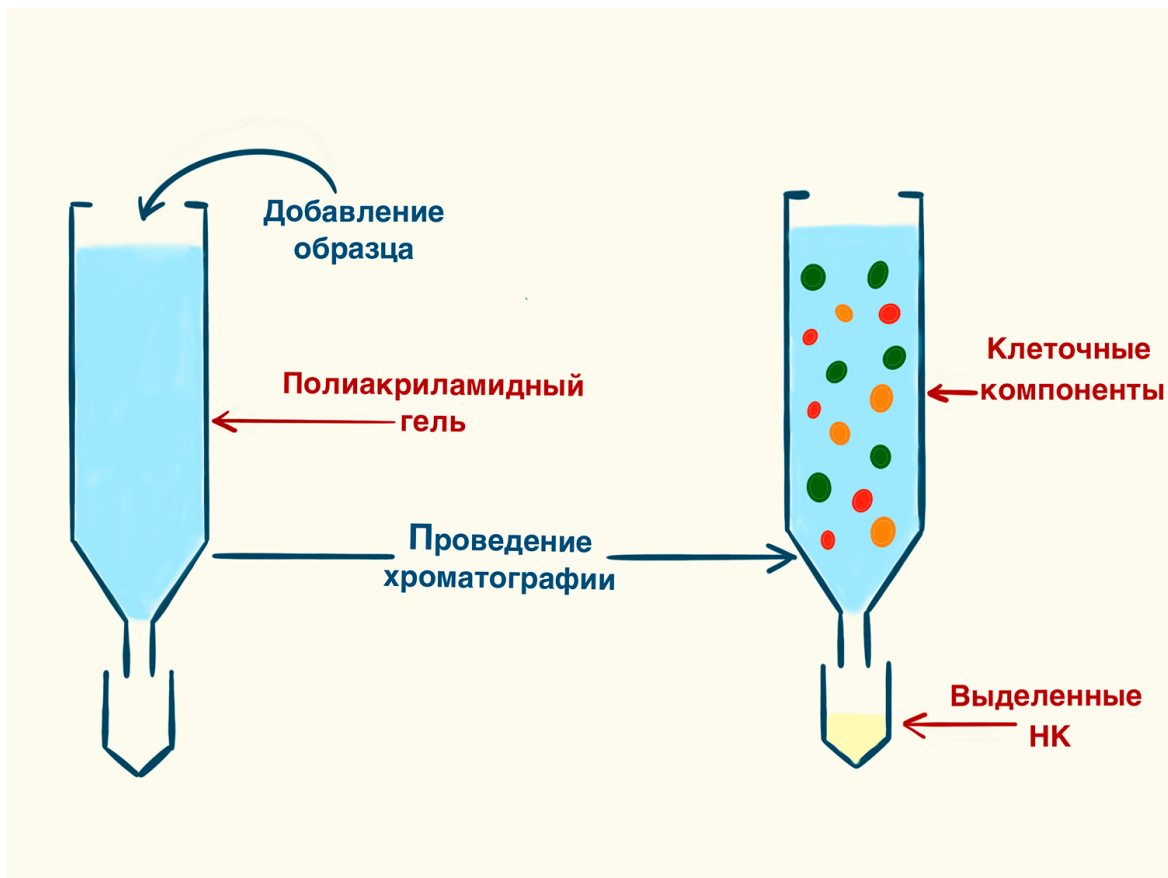


Ученые по всему миру приступили к экспериментам по изменению этапов изначальной методики и за более чем 150 лет значительно ушли вперед.

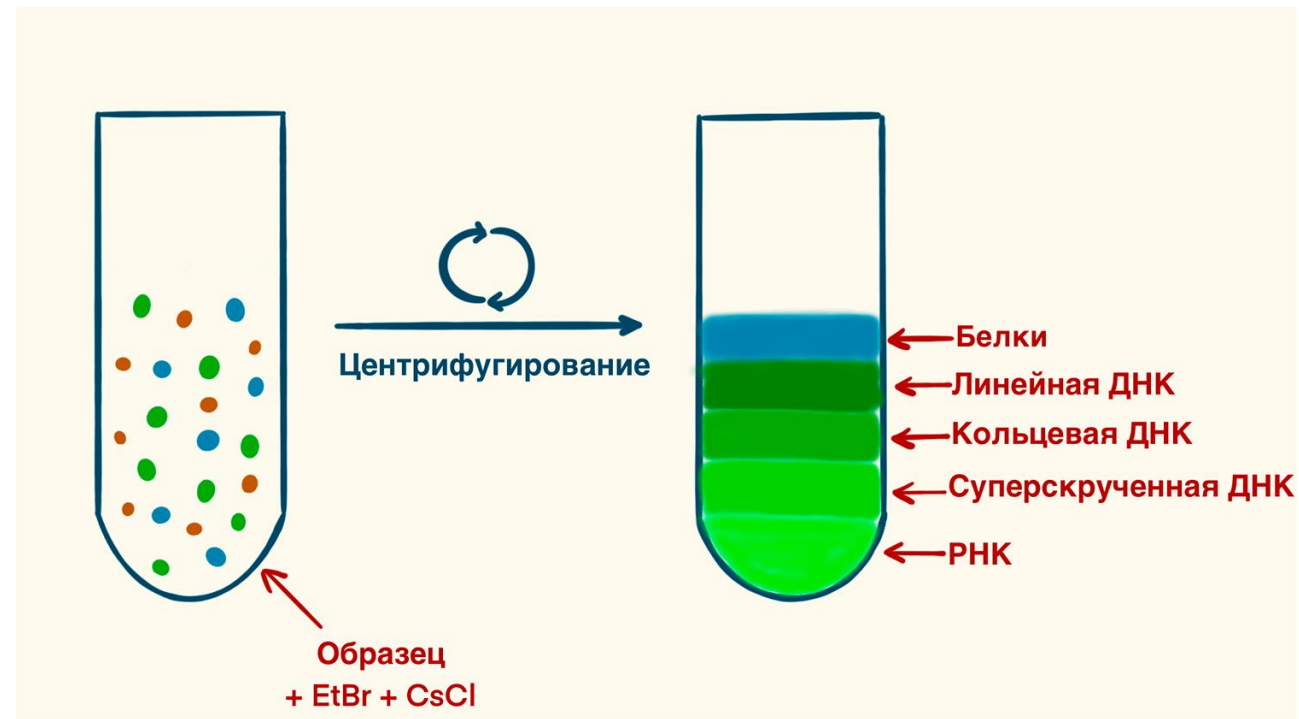
Классификация методов выделения нуклеиновых кислот. Условно методы по выделению ДНК можно разделить на химические и физические. В первых задействованы химические свойства веществ, например, фенол-хлороформа или протеиназы К, в основе вторых — разделение согласно с физическими особенностями молекул.

Таблица 1. Сравнение основных методов выделения нуклеиновых кислот.

Метод экстракции	Объекты	Преимущества	Недостатки
Хроматография SEC	Любые	Прост в использовании, относительно быстр	Сравнительно невысокий выход и качество НК. Не может эффективно отделять ДНК от РНК
Хроматография IEC	Любые	Прост в использовании, относительно быстр. Хорошо отделяет ДНК от РНК	Сравнительно невысокий выход и качество НК
Центрифугирование + EtBr-CsCl	Любые	Может эффективно изолировать плазмиды, а также геномную ДНК бактерий	Токсичные реагенты, дорогостоящий и трудоемкий. Чистота и выход НК относительно невелики
Щелочная	Предпочтительно — бактерии	Лучше для выделения плазмидной ДНК	Загрязнение выходного раствора хромосомной ДНК
Спин-колонки	Любые	Быстрый, простой и безопасный. Можно менять фильтры и отделять геномную ДНК от плазмидной или РНК.	Дорогой, сравнительно невысокий выход
Высаливание	Кровь, культура клеток, гомогенат	Бюджетный, безопасные реагенты	Может занять много времени
СТАВ	Растения	Эффективный метод для работы с растительными тканями, богатыми полифенолами и т.д.	Трудоемкий метод, возможна комбинация с другими подходами с использованием токсичных реагентов
Ферменты	Любые	Прост, безопасен, дает хорошее качество и выход НК	Дороже по расходным материалам, иногда требует длительной инкубации
Фенол-хлороформ	Любые	Хороший выход и качество НК	Токсичные реагенты, длительность
Магнитные частицы	Любые	Прост, быстр, точен, безопасен	Требуется настройка магнитного прибора
Стеклянные бусины	Любые	Можно комбинировать с нетоксичными буферами, хороший выход	Загрязнение итогового элюата бусинами
<i>Chelex-100</i>	Любые	Быстрый, экономичный, безопасный	Не удаляет примеси достаточно для дальнейшего использования с применением многих других методов
<i>SmartExtraction</i>	Любые	Нет необходимости в большом количестве оборудования, не токсичен, хороший выход	
Фильтровальная бумага	Любые	Экономичен, прост, безопасен, хороший выход	Не работает с малыми объемами



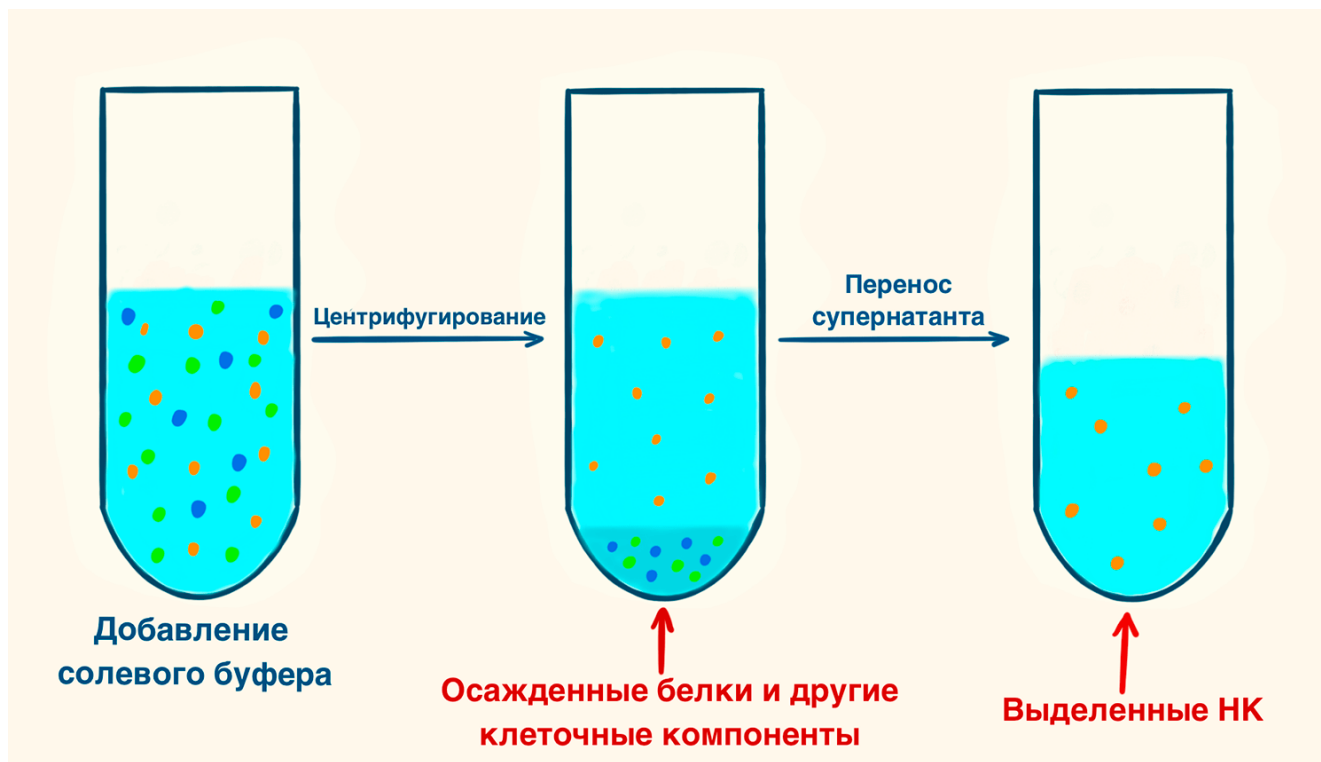
Принцип хроматографического выделения. Образцы помещают в полимер, например, полиакриламидный гель. По мере прохождения через него клеточные компоненты разделяются на фракции, в зависимости от размера молекул. Так, ДНК проходит через полимер быстрее, нежели мРНК или белки, продлевающие свой путь «путешествием» через поры в гранулах геля.



Разделение клеточных компонентов, в том числе и разных типов нуклеиновых кислот, при помощи центрифугирования. Так, седиментация и диффузия приводят к разделению молекул в растворе на фракции по градиенту плотности.



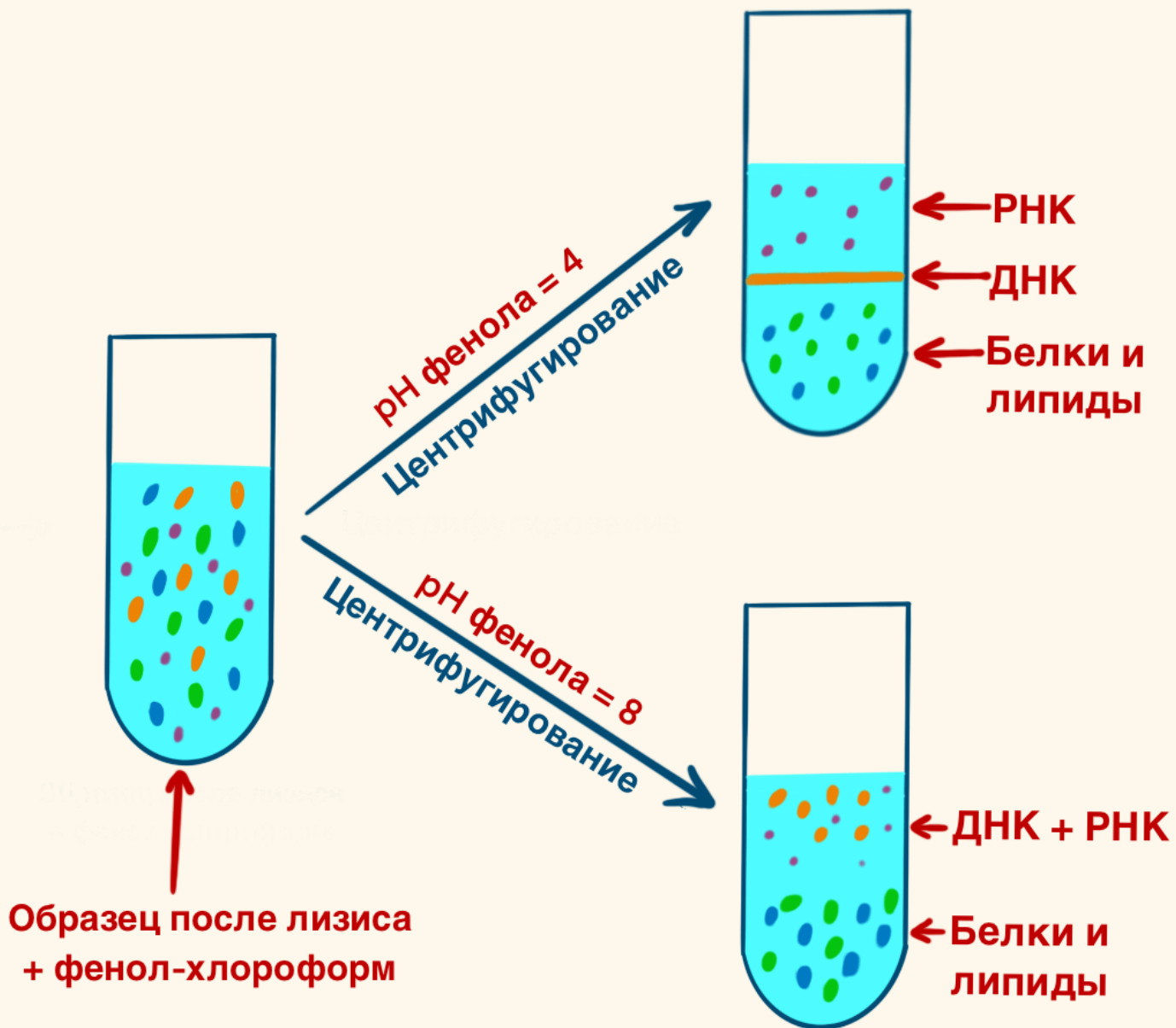
Последовательность выделения при помощи спин-колонок. После лизиса образец переносят в спин-колонку. Во время центрифугирования лизат частично проходит через кремниевый фильтр, при этом нуклеиновые кислоты остаются в спин-колонке и к ним добавляют этанол для осаждения и очищения. Последующее центрифугирование с буфером для элюции приводит к прохождению раствора с нуклеиновыми кислотами через спин-колонку.



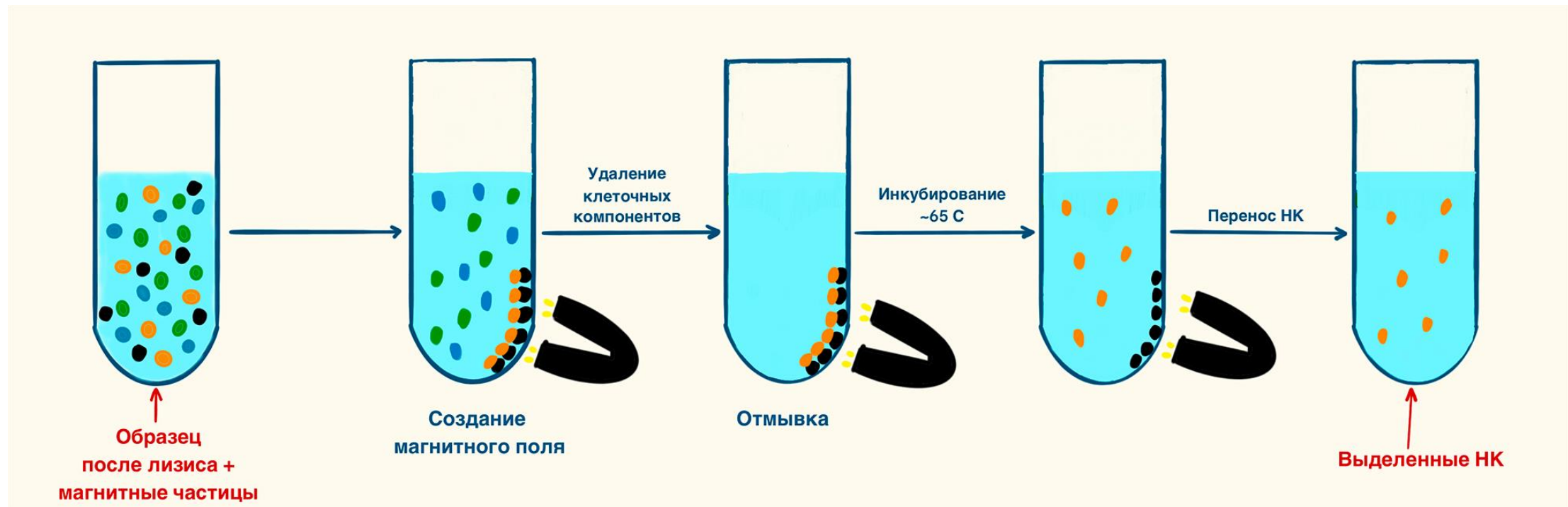
Выделение нуклеиновых кислот при помощи высаливания. Добавление к клеточному лизату солевого буфера приводит к осаждению белков и других клеточных компонентов после центрифугирования. Далее полученный супернатант с нуклеиновыми кислотами переносят в новую пробирку.



Набор GeneJET™ на спин-колонках помогает выделять ДНК из материала малого объема



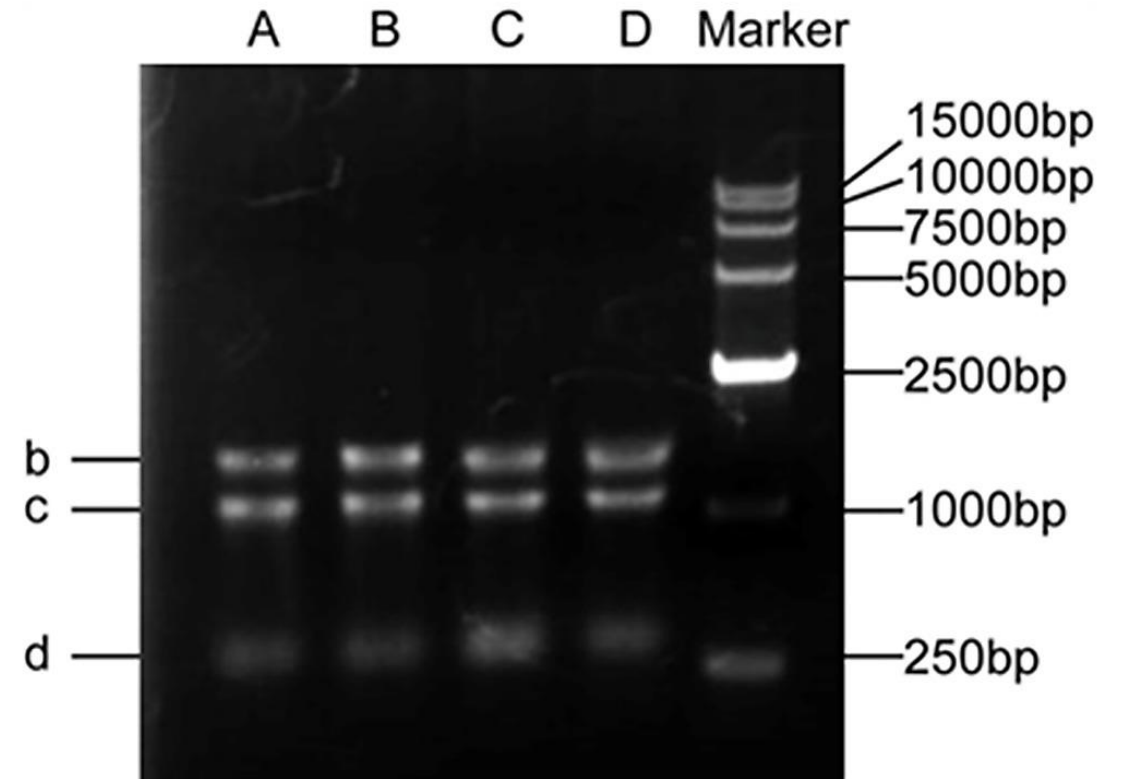
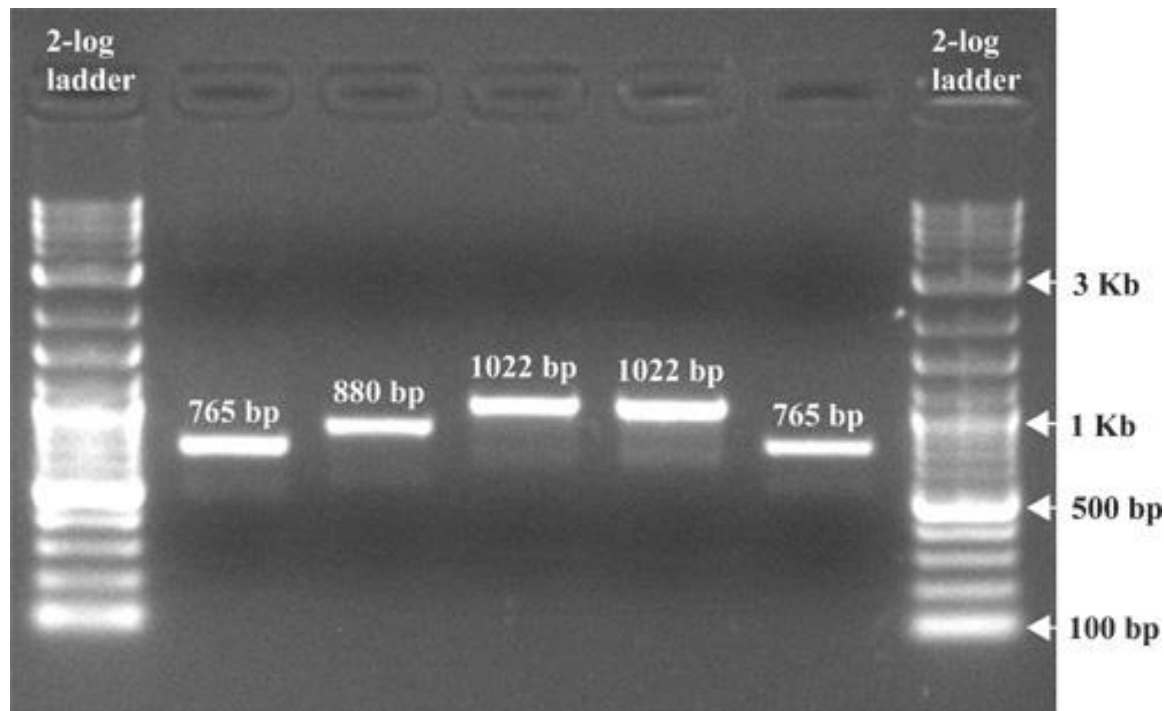
Выделение нуклеиновых кислот при помощи фенол-хлороформа. К клеточному лизату добавляют фенол-хлороформ. Фенол образует отдельную фазу, в которой находятся растворимые белки, в то время как нуклеиновые кислоты остаются в водной фазе. После центрифугирования смеси эти две фазы четко разделяются: фенольная фаза оказывается внизу, в то время как ДНК в водной фазе остается сверху. Теперь супернатант можно отделить, а ДНК промыть этанолом. Также использование фенола при разном pH раствора позволяет отделять ДНК от РНК. Так, при pH=4, они образуют отдельные фракции, в то время как при pH=8 только одну общую.



Выделение нуклеиновых кислот при помощи магнитных частиц. К клеточному лизату добавляют магнитные частицы, на поверхности которых адсорбируются нуклеиновые кислоты. Создание магнитного поля внешним источником приводит к концентрации магнитных частиц на дне пробирки, после чего остальной лизат удаляют. После отмывки и инкубирования нуклеиновые кислоты отделяются от магнитных частиц и могут быть перенесены в другую пробирку.

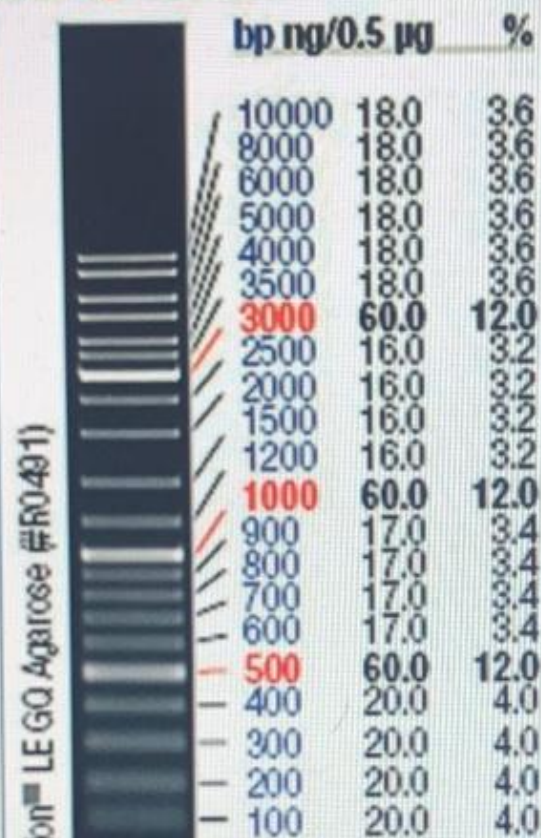
Электрофорез в агарозном геле

- **Электрофорез** – метод разделения макромолекул, различающихся по таким параметрам, как размеры (или молекулярная масса), пространственная конфигурация, вторичная структура и электрический заряд.



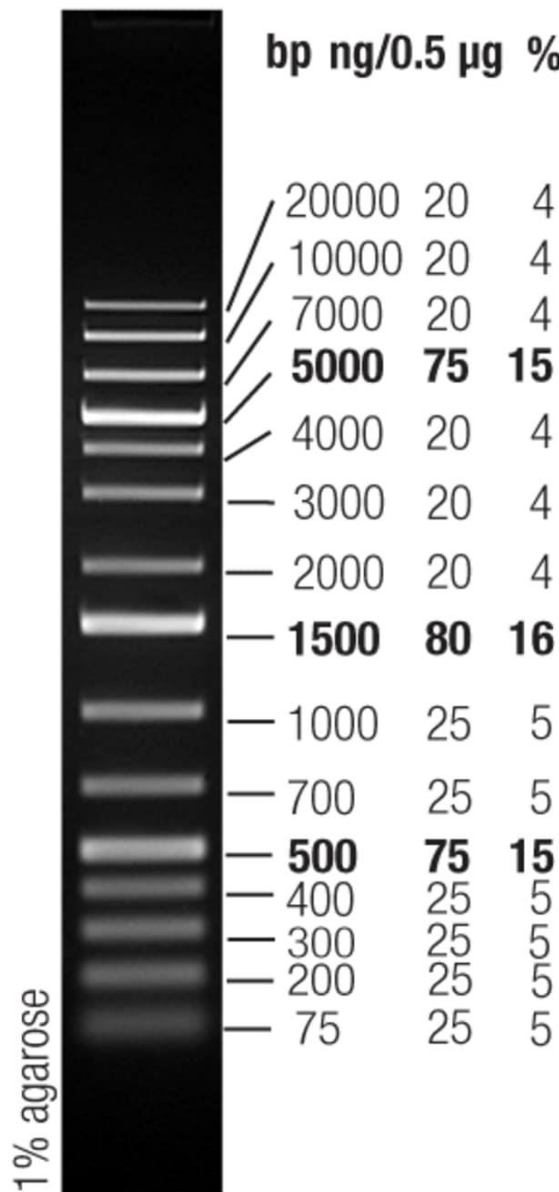
GeneRuler™ DNA Ladder Mix

O'GeneRuler™ DNA Ladder Mix, ready-to-use



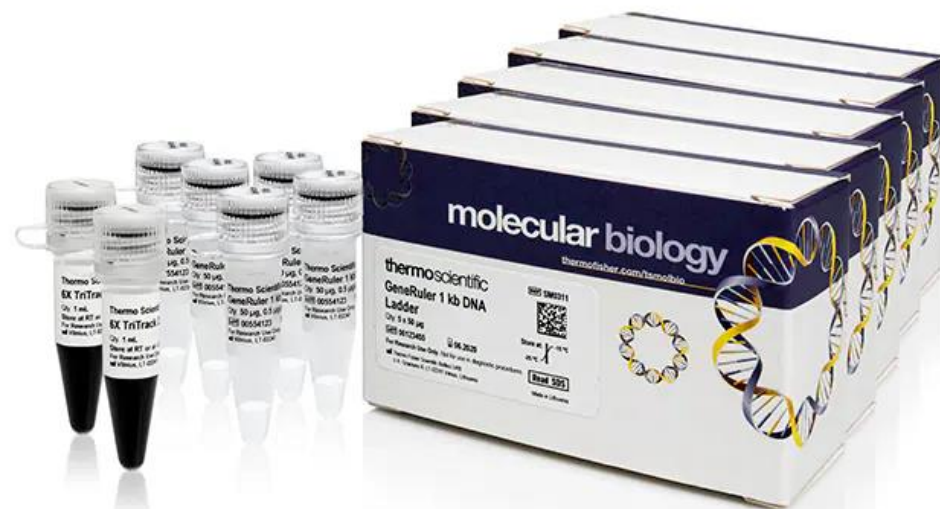
0.5 µg/lane, 8 cm length gel,
1X TAE, 7 V/cm, 45 min

bp ng/0.5 µg %



1% agarose

0.5 µg/lane, 8 cm length gel,
1X TAE, 7 V/cm, 45 min

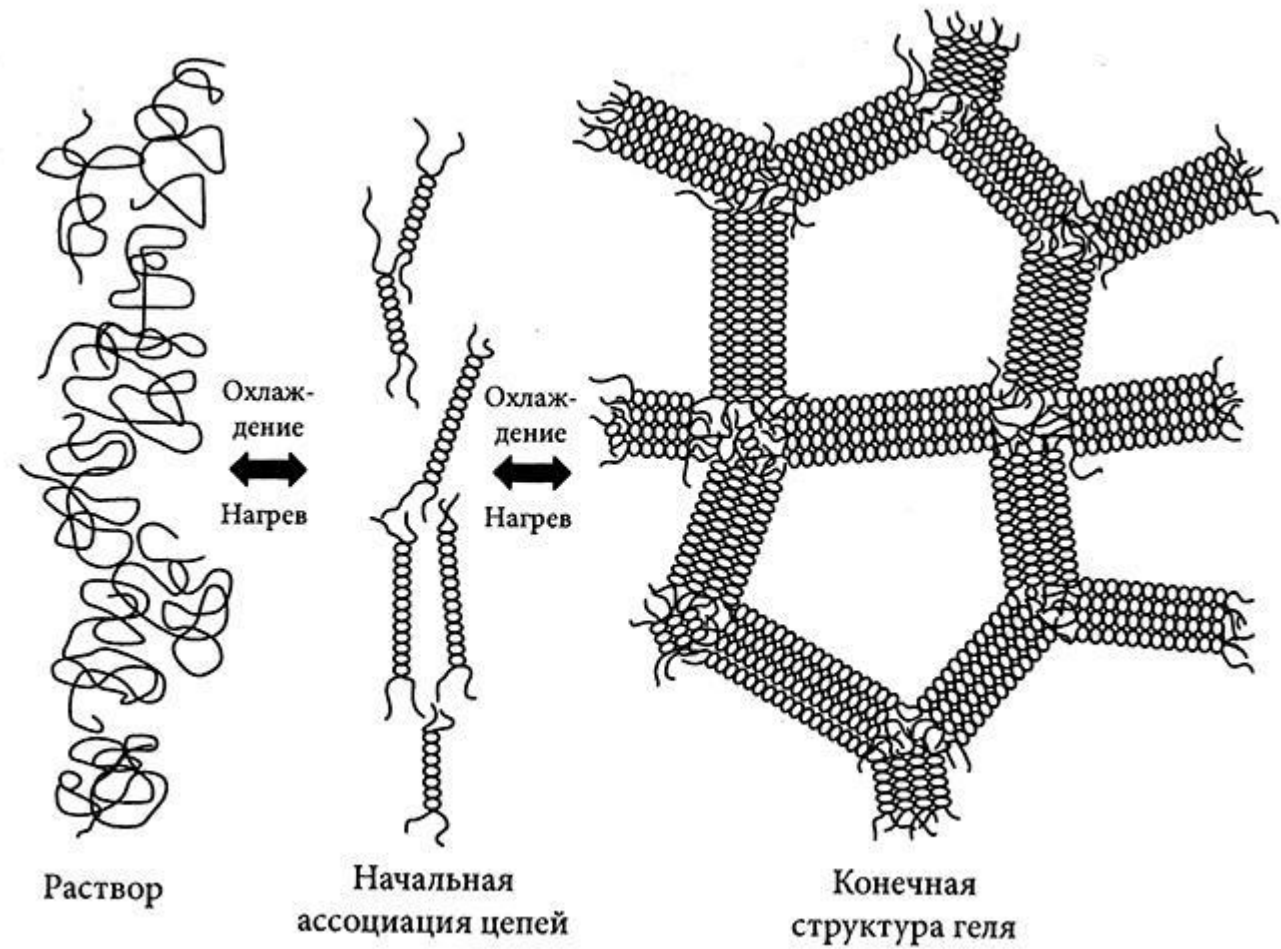


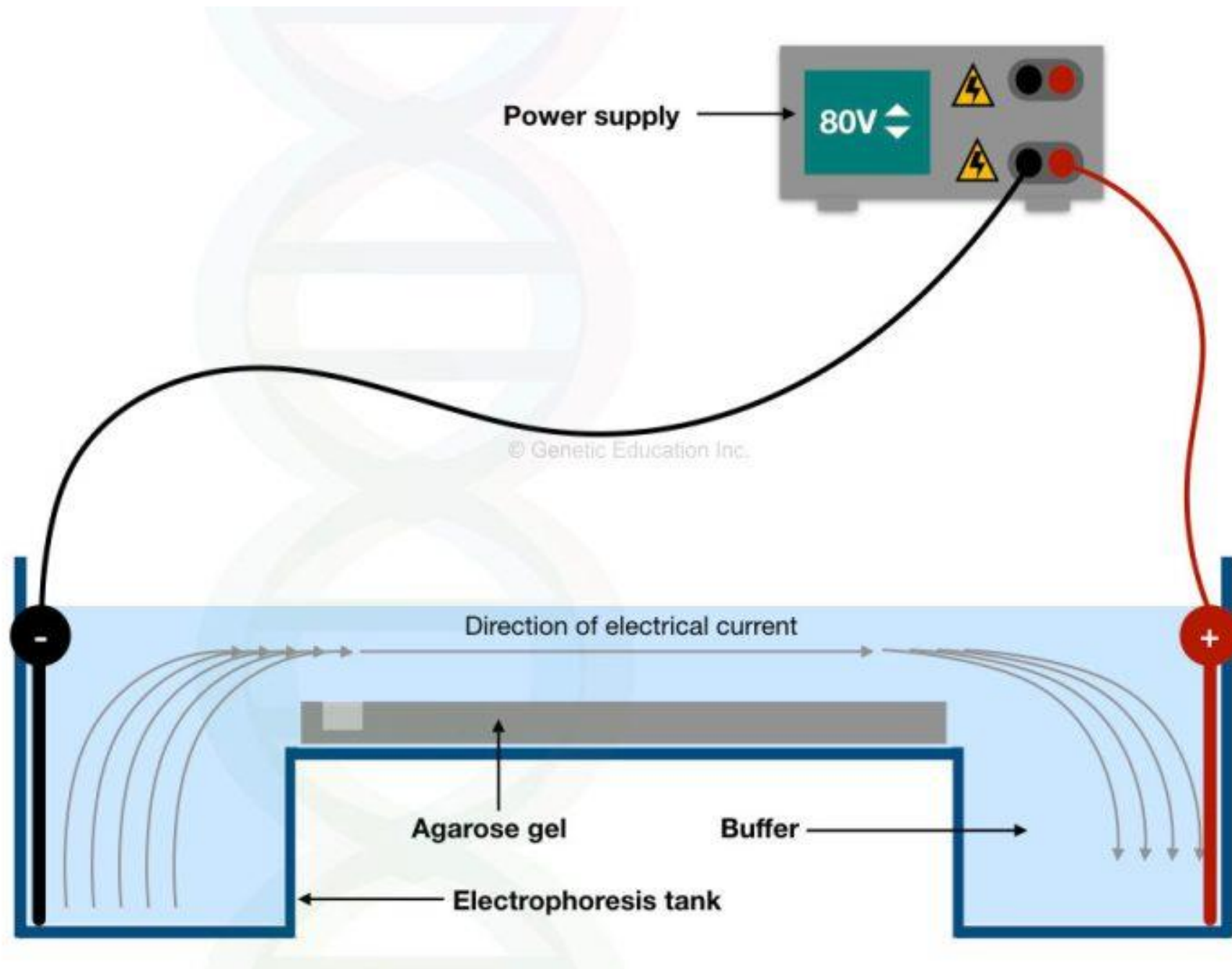
- **Электрофорез** проводится в камере, заполненной буферным раствором. Чаще всего используются буферы, содержащие ЭДТА, трис и борную кислоту: **TAE** и **TBE**.
- Буфер необходим для повышения **ионной силы** раствора, в котором будет происходить разделение молекул ДНК под действием приложенного электрического поля.
- После разделения фрагменты ДНК разной длины визуализируют при помощи **флуоресцентных красителей**, специфично взаимодействующих с ДНК.



Принцип метода:

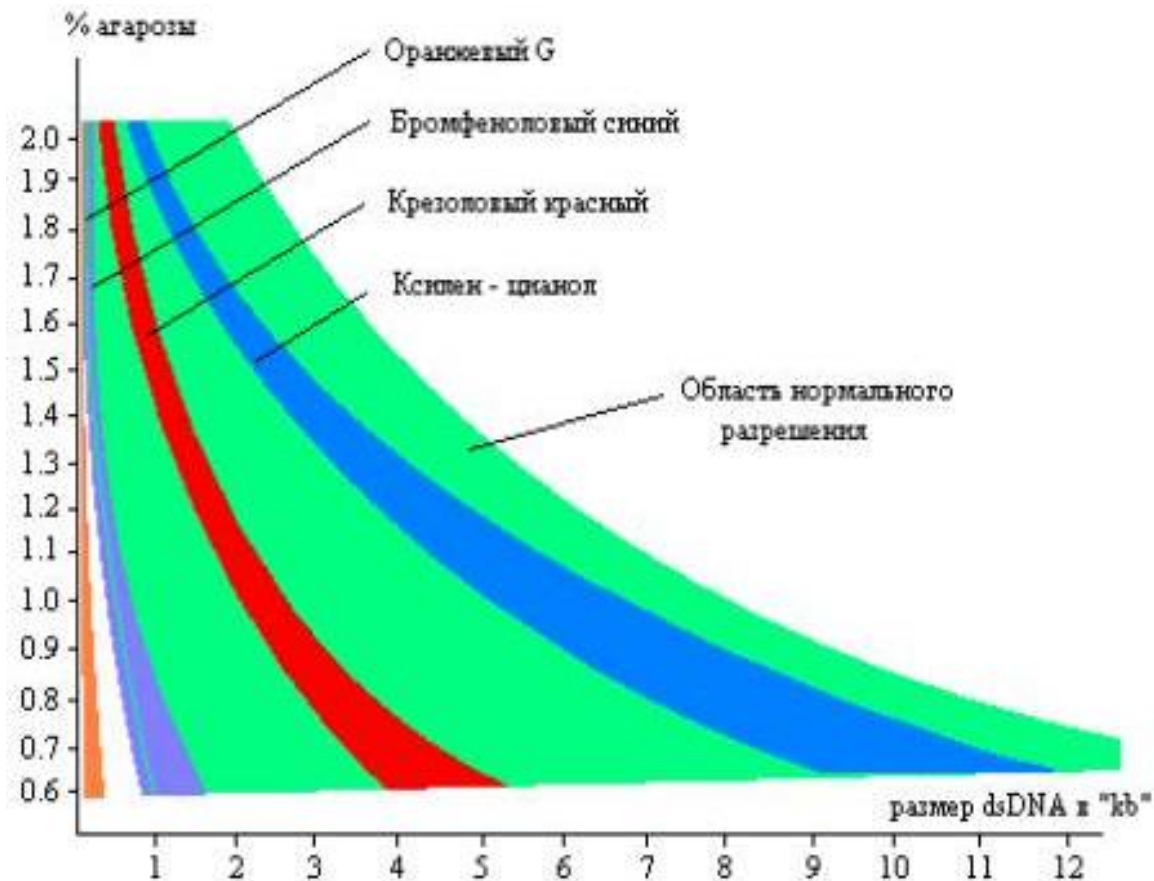
- Находящиеся в буферном растворе макромолекулы обладают некоторым **суммарным электрическим зарядом**, величина и знак которого зависит от **pH среды**.
- Если через этот раствор, заключенный в канал из изолирующего материала начать пропускать электрический ток, то вдоль канала установится определенный **градиент напряжения**, т.е. сформируется электрическое поле.
- Под действием поля макромолекулы в соответствии со своим суммарным зарядом мигрируют в направлении катода или анода, причем их трение об окружающую среду ограничивает скорость миграции. В зависимости от величины заряда и размеров молекулы приобретают различные скорости.





- **Агароза** – это особо чистая фракция природного линейного полисахарида агара, который получают из морских красных водорослей (*Gracilaria*, *Gelidium*, *Ahnfeltia*).
- Агароза состоит из строго чередующихся остатков **3-Озамещенной-β-D-галактопиранозы** и **4-О-замещенной 3-6-ангидро-α-L-галактопиранозы**. Молекулярная масса ее составляет 10^4 - 10^5 . Гелеобразование идет путем связывания в пространственную сетку пучков нитей за счет водородных связей между ними. Некоторые виды агарозы образуют прочные гели уже при концентрации 0,3%.
- При температурах **84-96°C** (а у специальных типов – уже при 70°C) раствор агарозы переходит в прозрачную жидкость – «плавится».
- Агарозы затвердевают, образуя гель, при значительно более низких температурах (**36-42°C**).

- В ходе электрофореза зоны макромолекул остаются невидимыми. Для наблюдения за процессом в исходный препарат добавляют краситель, молекулы которого несут электрический заряд того же знака, что и фракционируемые молекулы, но не взаимодействуют с ними.
- Краситель тоже передвигается в электрическом поле, но уже в виде окрашенной зоны. Его подбирают таким образом, чтобы скорость миграции наиболее подвижных макромолекул была несколько ниже, чем у молекул красителя. Когда окрашенная зона доходит до конца трубки, электрофорез прекращают.



Выбор красителя:

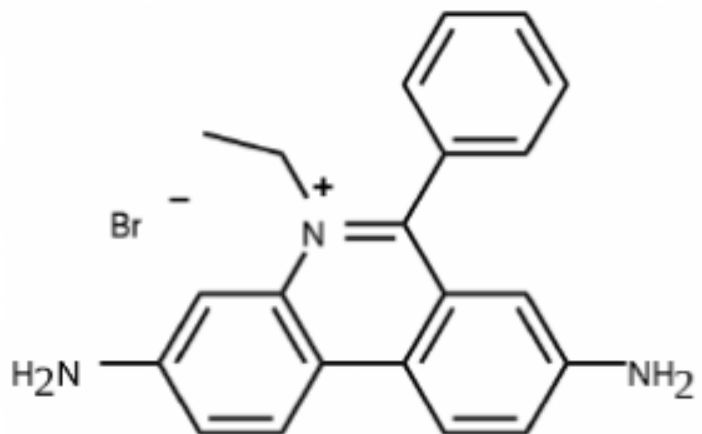
- **Бромфеноловый синий** и **ксиленцианол** - могут заметно мешать наблюдению фрагментов под UV.
- **Cresol red** - совместим с ферментативными реакциями, практически не мешает наблюдению под UV.
- **OrangeG** – наиболее подвижный краситель, практически всегда находится вне "рабочей зоны". Заметен под UV.

Буфер для внесения 10х:

SDS	0.5%
EDTA, pH8.0	0.1M
глицерол	50%
H ₂ O	

Напряжённость электрического поля

- Разумный компромисс между скоростью и качеством фореа для высококачественных или препаративных фореа: $\sim 2\text{V/cm}$. Для аналитических фореа приемлемое качество сохраняется до $\sim 6\text{V/cm}$.
- **Бромистый этидий** образует с фрагментами ДНК устойчивое соединение внедрения, проявляющееся в виде светящихся полос при облучении геля УФ-излучением с длиной волны 290-330 нм.
 - 10 мкг/мл для фореа



Разделение линейных молекул

Диапазон нормального разделения линейных dsDNA молекул для гелей с различной концентрацией агарозы:

% агарозы	0.3	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0	1.2	1.5	2.0
Размер DNA [kbp]	5-60	1-30	1-20	0.8-12	0.6-10	0.5-8	0.5-7	0.4-6	0.2-3	0.1-2

Меньший предел определяется (в основном) диффузией полосы в геле. Т.е. в гелях с низкой концентрацией агарозы мелкие фрагменты вполне разделяются, но полосы не четкие.

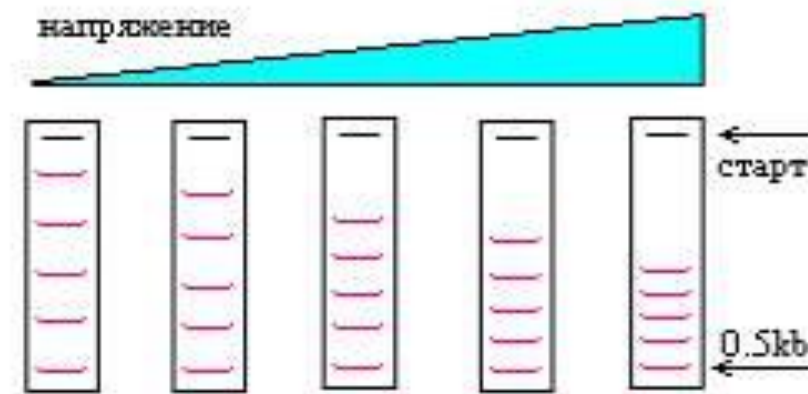
Верхний предел сильно зависит от напряженности поля, при которой проводится форе́з. Чем меньше напряженность поля, тем более длинные молекулы можно эффективно разделить.

- **Одноцепочечная DNA**

- На 1% агарозном фореze ssDNA бежит чуть быстрее (~10%), чем dsDNA того же размера. ssDNA окрашивается EtBr заметно слабее, чем ds (разница в ~4-5 раз). То есть, чтобы полосы имели одинаковую интенсивность окраски, требуется взять ~ в 5 раз больше ssDNA.

Напряжённость поля

- При оценке напряженности поля для горизонтального фореа принято пренебрегать конкретной геометрией камеры и измерять расстояние непосредственно между электродами.
- На рисунке показана схема фореа, при разном напряжении. Фореа проводились разное время, так, чтобы 0.5kb фрагмент прошел одинаковое расстояние. Видно, что проведение фореа при высоком напряжении эквивалентно уменьшению длины геля.
- Разумный компромисс между скоростью и качеством фореа для высококачественных или препаративных фореа: $\sim 2\text{V/cm}$ (можно меньше для ON фореа). Для аналитических фореа приемлемое качество сохраняется до $\sim 6\text{V/cm}$.



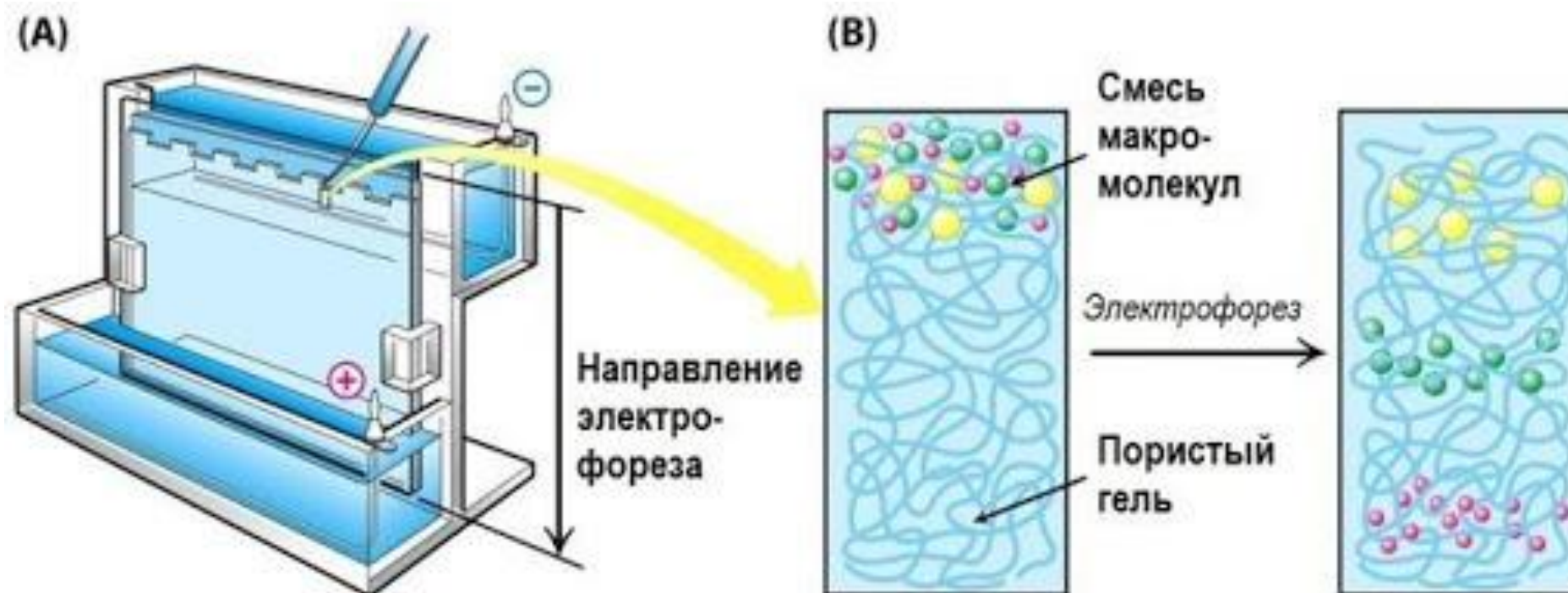
- **TAE; Prepare a 10x stock solution in 1 liter of H₂O:**
- 48.4 g Tris base [tris(hydroxymethyl)aminomethane]
- 11.4 ml glacial acetic acid (17.4 M)
- 20 ml of 0.5 M EDTA or 3.7 g EDTA, disodium salt

- **TBE; Prepare a 10x stock solution in 1 liter of H₂O:**
- 48.4 g Tris base [tris(hydroxymethyl)aminomethane]
- 55 g of boric acid
- 40 ml of 0.5 M EDTA (pH 8.0)

- **6x Gel-loading Buffer I**
- 0.25% (w/v) bromophenol blue
- 0.25% (w/v) xylene cyanol FF
- 40% (w/v) sucrose in H₂O

ПААГ электрофорез ДНК

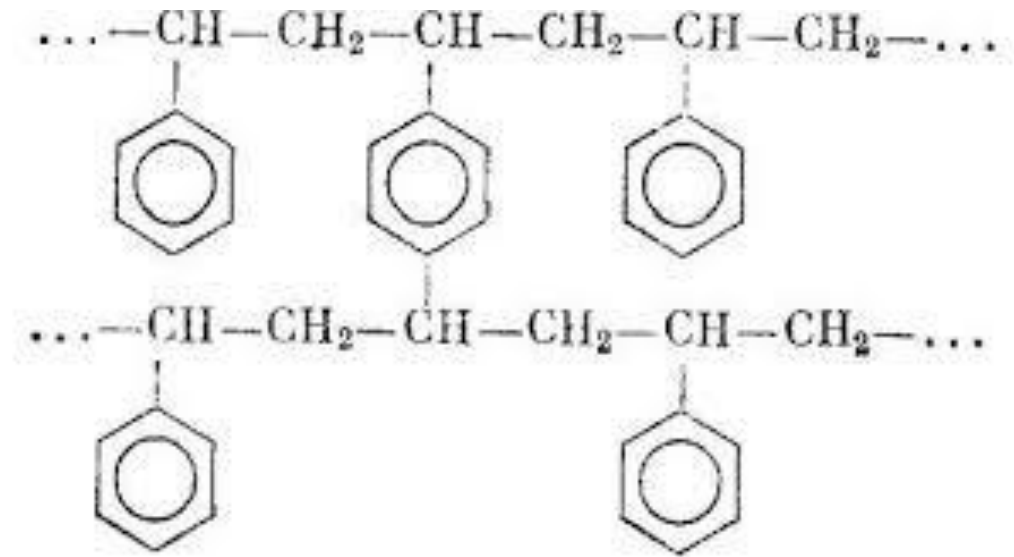
Вертикальный электрофорез представляет собой метод разделения заряженных макромолекул в полиакриламидном геле (ПААГ) под действием электрического поля. По сей день метод остается одним из популярных в молекулярной биологии и широко применяется лабораториями различного профиля для определения и анализа (нуклеиновых кислот) НК и белков, а также их фрагментов.



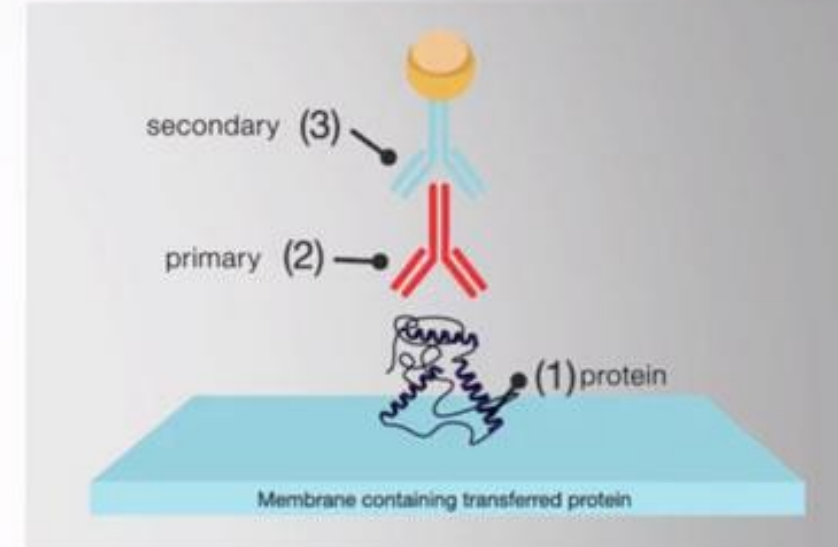
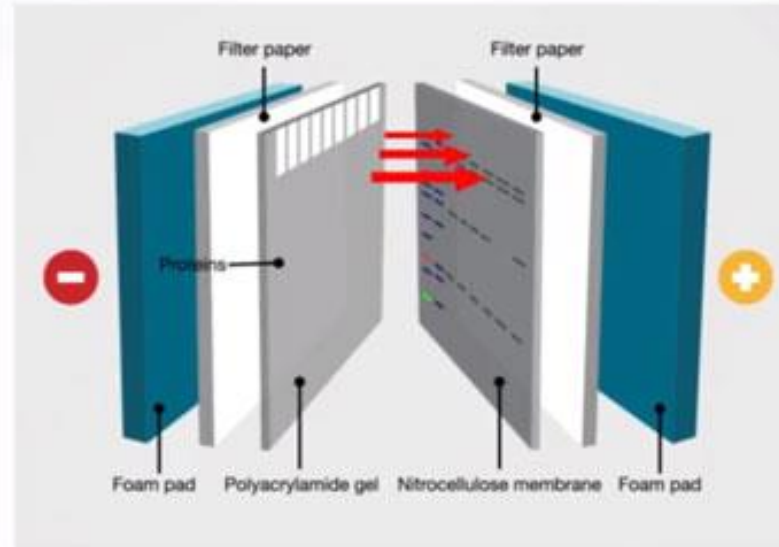
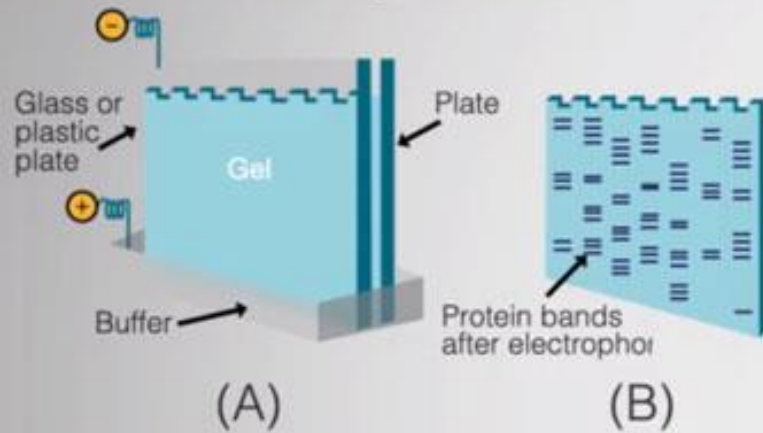
Принцип работы вертикального электрофореза

- **Электрофорез в ПААГ** базируется на разделении молекул в электрическом поле в условиях ограниченной диффузии. Для этого гель устанавливается вертикально между анодным и катодным буферными резервуарами. ПААГ является матрицей, которая позволяет разделить белки и НК по их размеру и заряду. С помощью гребенки создаются лунки, в которые наносятся образцы. Для визуализации движения фрагментов в образцы добавляют краситель для отслеживания с более высокой электрофоретической подвижностью.
- Электрическое поле, создаваемое двумя электродами – анодом и катодом, проходя через гель, задает движение молекул белков и нуклеиновых кислот к аноду.

- На подвижность макромолекул в геле влияют разные факторы, которые стоит учитывать при проведении анализа. Основными из них являются:
- **Заряд.** При увеличении суммарного заряда возрастает подвижность молекул.
- **Размеры.** Проходя через гель более крупные молекулы задерживаются в порах геля, меньшие — более подвижные, проходят дальше, поэтому в результате электрофореза меньшие молекулы будут располагаться дальше от места нанесения, чем большие.
- **Форма.** На подвижность также влияет форма молекулы. При наличии одного и того же размера, но разной формы, молекулы будут иметь разную подвижность. Например, глобулярные и фибриллярные белки.
- **Размер пор ПААГ.** Молекулярное сито **полиакриламидного геля** задает скорость движения молекул в зависимости от размера пор. Чем меньше поры, тем медленнее движутся в нем крупные молекулы в отличие от мелких. Нужная пористость геля задается его концентрацией, которая может варьировать от 2 до 50%.
-



Sample wells



1. Separate

proteins by gel electrophoresis

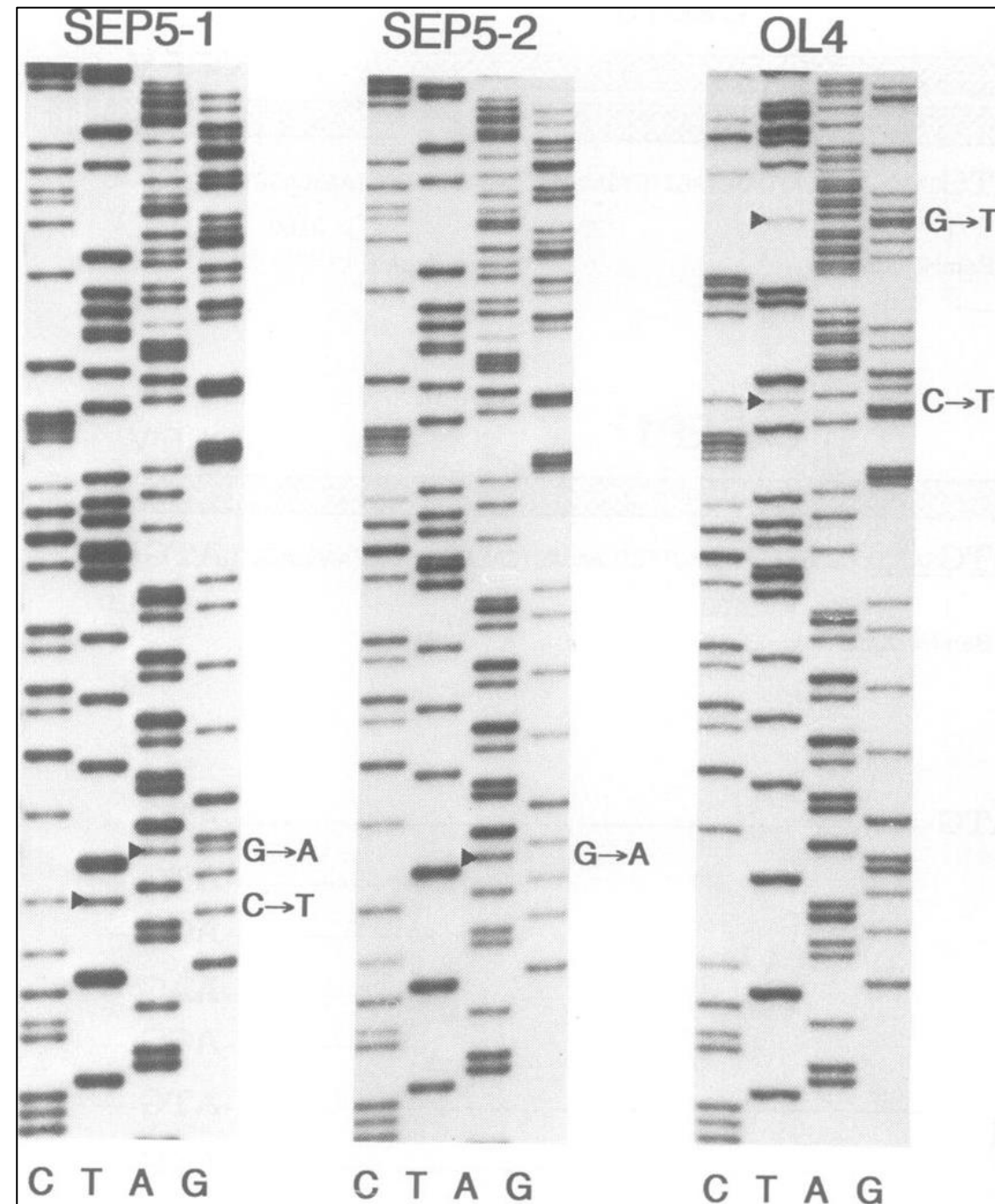
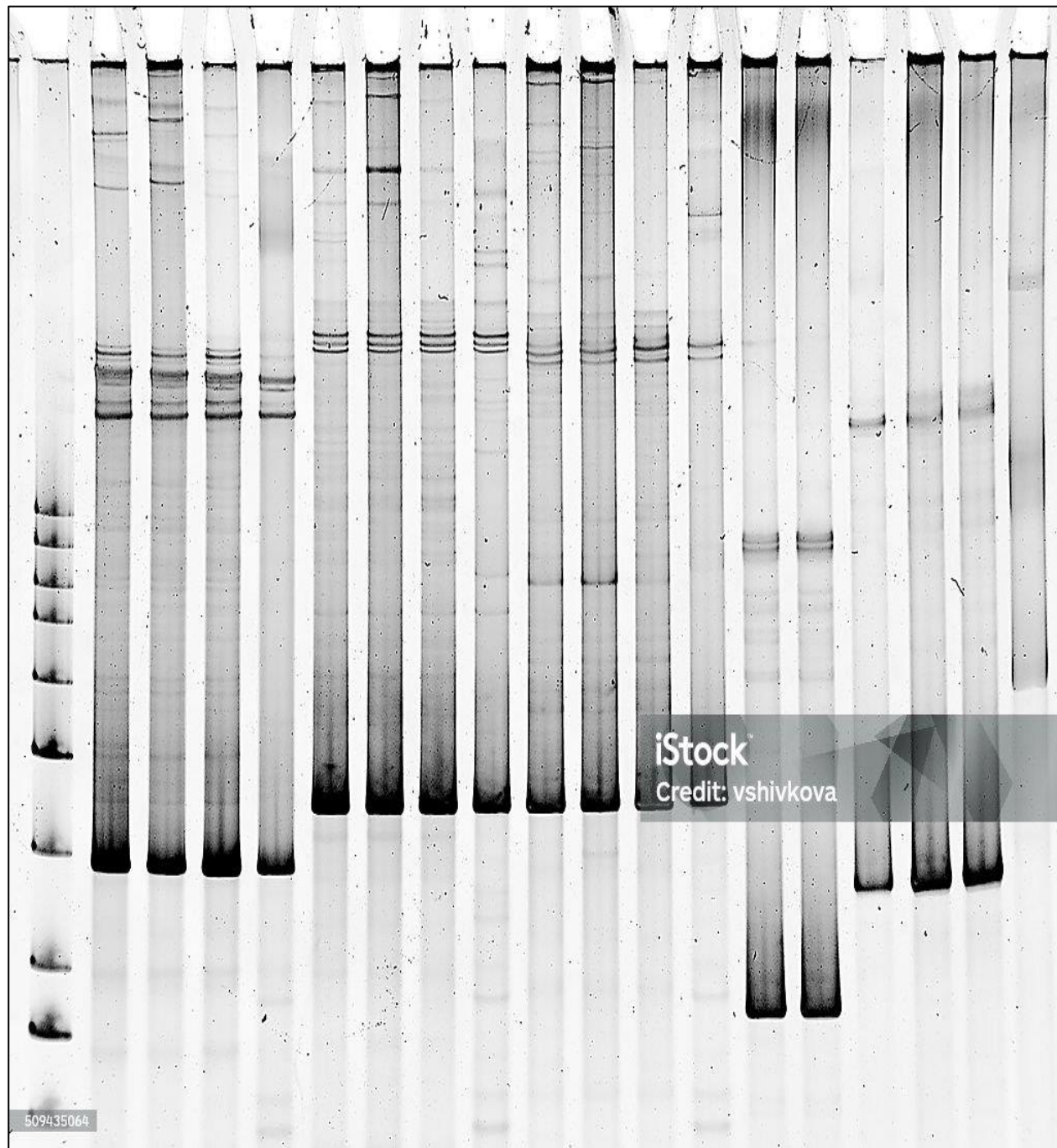
2. Transfer

proteins from the gel to a solid support

3. Detect

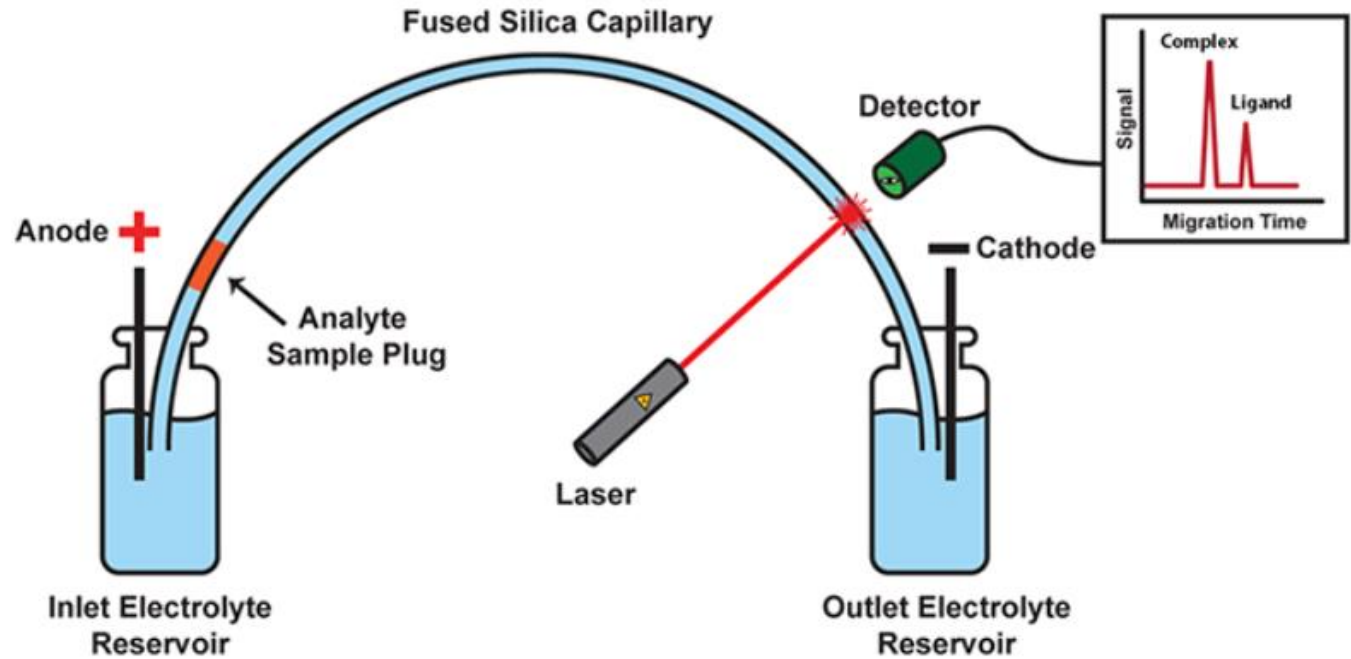
Where we use antibodies specific to the target protein to visualize the protein of interest.





Капиллярный электрофорез

Капиллярный электрофорез (КЭ) – это альтернативный метод гель-электрофореза, основанный на разделении компонентов анализируемой смеси внутри капилляра, содержащего электролит, под действием электрического тока.



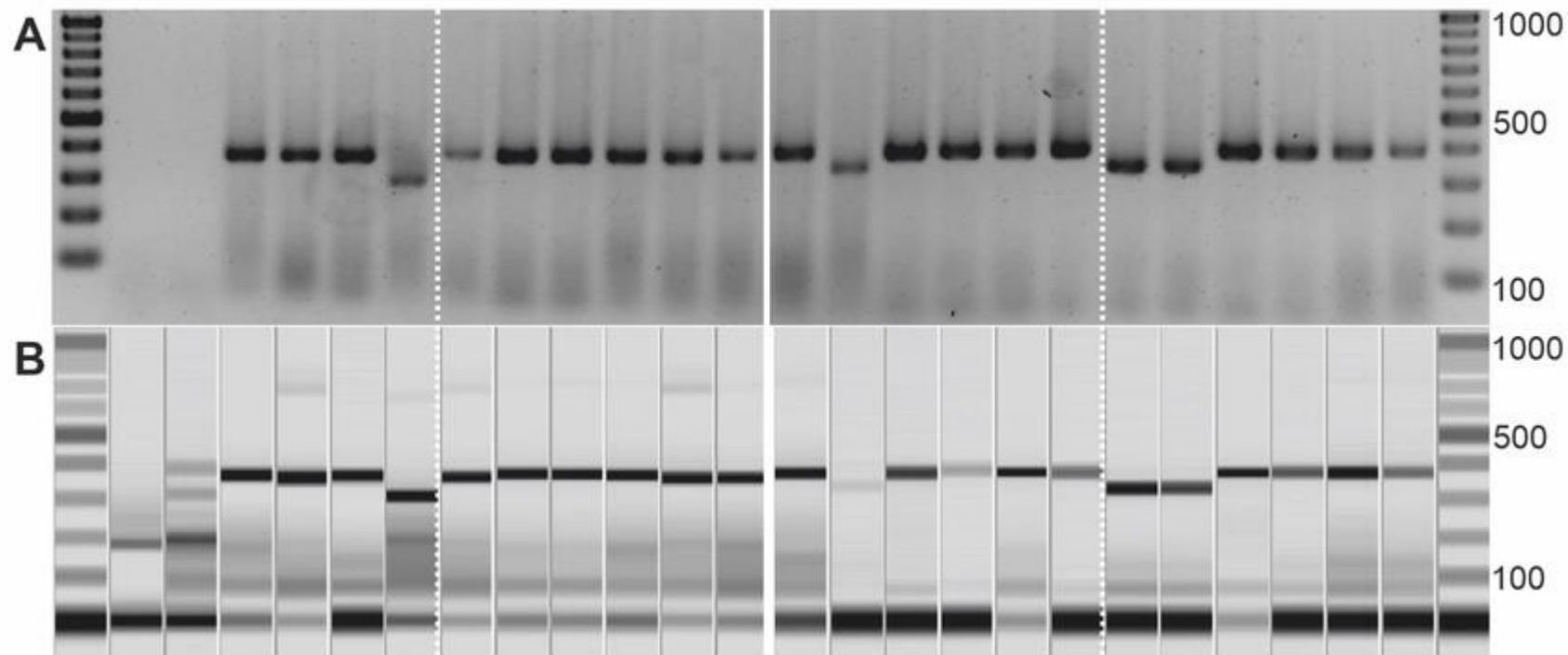


Рис. Сравнение стандартного геля-электрофореза и капиллярного геля-электрофореза MultiNA для анализа ПЦР колоний. (А) Аннотированное изображение геля. (В) Виртуальное изображение геля, созданное на основе данных геля-электрофореза. Размеры линейных фрагментов ДНК показаны справа, в парах оснований (п.н.). В качестве маркера использовался NEB 1 kb Plus DNA Ladder.

Методы анализа нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) делятся на несколько групп в зависимости от целей анализа:

1. Количественные методы

Используются для определения концентрации нуклеиновых кислот.

Спектрофотометрия (260/280) – быстрый метод для оценки чистоты и концентрации.

Флуорометрия (Qubit, PicoGreen) – более точное определение концентрации.

qPCR (Реальное время) – позволяет количественно определить специфические последовательности ДНК или РНК.

2. Качественные методы

Оценивают целостность и размер молекул.

Агарозный гель-электрофорез – определение размера ДНК/РНК.

Капиллярный электрофорез (Bioanalyzer, TapeStation) – высокоточная оценка качества и размера.

3. Методы секвенирования

Определяют полную или частичную последовательность нуклеотидов.

Классическое секвенирование по Сэнгеру – для коротких участков ДНК.

NGS (Next-Generation Sequencing) – массовое параллельное секвенирование, подходящее для геномных исследований, РНК-секвенирования, метагеномики.

Nanopore sequencing (Oxford Nanopore) – длинные риды, позволяет читать последовательности в реальном времени.

4. Методы амплификации

ПЦР (полимеразная цепная реакция) – стандартный метод амплификации ДНК.

RT-PCR – амплификация РНК через обратную транскрипцию.

LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) – изотермическая амплификация, удобна для быстрой диагностики.

5. Методы гибридизации

Саузерн-блоттинг (Southern blot) – для поиска специфических последовательностей ДНК.

Норзерн-блоттинг (Northern blot) – для анализа РНК.

FISH (флуоресцентная гибридизация in situ) – локализация последовательностей в хромосомах или тканях.

6. Методы анализа метилирования и эпигенетики

Бисульфитное секвенирование – для определения метилирования ДНК.

ChIP-seq (Chromatin Immunoprecipitation) – анализ взаимодействия ДНК с белками.

7. Методы анализа структуры и взаимодействия

CD-спектроскопия (круговой дихроизм) – анализ вторичной структуры.

SPR (поверхностный плазмонный резонанс) – исследование взаимодействия нуклеиновых кислот с белками или другими молекулами.

Литература

1. <https://biomolecula.ru/articles/vydelaem-nukleinovye-kisloty-evoliutsiia-metodov>
2. Dahm R. Friedrich Miescher and the discovery of DNA. Dev Biol. 2005;278(2):274–288.
3. 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.
4. Meselson M, Stahl FW. The replication of DNA in Escherichia coli. Proc Natl Acad Sci U S A. 1958;44(7):671–682.
5. Tan SC, Yiap BC. DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present. J Biomed Biotechnol. 2009;2009:574398.
6. V. Glisin, R. Crkvenja, C. Byus, Ribonucleic-Acid Isolated by Cesium-Chloride Centrifugation, 547 Biochemistry, 13 (1974) 2633-2637.
7. 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.
8. 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.
9. <https://www.future-science.com/doi/pdf/10.2144/000113959>
10. Chomczynski, P. and Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidine thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. 162:156-159.
11. 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.
12. 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.
13. Chomczynski, P. 1989. Product and process for isolating RNA. U.S. Patent #4,843,155.
14. 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.

ЛИТЕРАТУРА

1. http://www.biotechnolog.ru/ge/ge3_1.htm
2. Щелкунов С.Н. «Генетическая инженерия», Учебно-справочное пособие. 3-е изд. Новосибирск: СУИ, 2008 – 514 с
3. Жимулев И.Ф. «Общая и молекулярная генетика» учебное пособие. Новосибирск: СУИ, 2007.
4. Sambrook J., Russell D.W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd edition), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, NY.
5. Маниатис Т., Фрих Э., Сэмбрук Д. Молекулярное клонирование. – М.: Мир, 1984.
6. Sambrook J., Russell D.W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 4th edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.
7. Green M.R., Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 4th edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.
8. Brown T.A. Gene Cloning and DNA Analysis: An Introduction. 7th edition. Wiley-Blackwell, 2016.
9. Lodish H., Berk A., Zipursky S.L. Molecular Cell Biology. 9th edition. W.H. Freeman, 2021.
10. Ausubel F.M. et al. Current Protocols in Molecular Biology. Wiley, 2002.