

Методы очистки олигонуклеотидов.

Для всех олигонуклеотидов, в зависимости от их структуры (длина, наличие модификаций) и масштаба синтеза, подбираются соответствующие способы очистки для получения максимально чистого продукта в кратчайшие сроки. На всех стадиях очистки используется специально подготовленная вода и растворы, что обеспечивает длительные сроки хранения и высокую стабильность синтезированных олигонуклеотидов. Основными способами очистки являются:

Гель-фильтрация (ГФ или обессоливание; степень очистки 80-90%) является основным способом очистки для немодифицированных олигонуклеотидов длиной не более 40 оснований и олигонуклеотидов с большим количеством вырождений (более пяти). Очищенные таким способом олигонуклеотиды могут быть использованы для стандартной ПЦР, производства ДНК-чипов, секвенирования. Для использования в генно-инженерных работах необходима дополнительная очистка ПААГ.

Обратно-фазовые картриджи (ОФ-картриджи; степень очистки более 90%) используются для очистки немодифицированных олигонуклеотидов с длиной не более 40 оснований, а также олигонуклеотидов с модификациями аминокислотной группой или инозином. Очищенные таким способом олигонуклеотиды могут быть использованы во всех работах, кроме генно-инженерных.

Электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ электрофорез; степень очистки 95-99%) используется для очистки олигонуклеотидов длиной более 40 оснований, олигонуклеотидов с модификациями флуорофорами (кроме Су) или гасителями, а также флуоресцентных зондов. Необходим для очистки всех олигонуклеотидов для генно-инженерных работ.

Высокоэффективная жидкостная хроматография на обратной фазе (ОФ-ВЭЖХ, степень очистки 95-99%) позволяет очищать большие количества любых олигонуклеотидов (20 о. е. и выше), олигонуклеотиды с модификациями флуорофорами, гасителями и флуоресцентные зонды. Часто используется как дополнительный способ очистки для всех типов олигонуклеотидов.

Таблица №1 Рекомендуемые способы очистки

Рекомендуемые способы очистки	Гель-фильтрация (обессоливание)	ОФ-Картриджи	ПААГ электрофорез*	ОФ-ВЭЖХ*
Степень очистки	80-90%	90-95%	95-99%	95-99%
Немодифицированные олигонуклеотиды				
Длиной до 40 н.о.	+	+	(+)	
Длиной более 40 н.о.			+	+
С вырожденностью более 5 н.о	+		(+)	
В количестве от 20 о. е.				+
<i>(+) Все немодифицированные олигонуклеотиды для применения в генной инженерии должны быть дополнительно очищены методом ПААГ.</i>				
Модифицированные олигонуклеотиды				
С аминлинкером или инозином		+		
С биотином			+	
С флуорофорами (кроме Cy) или гасителями			+	
С флуорофорами Cy3, Cy5				+
Флуоресцентные зонды**			+	+

* - Может использоваться для дополнительной очистки (если не основная).

** - Рекомендуется двойная очистка ПААГ+ОФ-ВЭЖХ.

Методы контроля:

Все олигонуклеотиды проходят обязательную стадию контроля чистоты с помощью ПААГ электрофореза или ОФ-ВЭЖХ, а также измерения количества (концентрации) методом спектрофотометрии.