



**ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
“РАЗВИТИЕ НА ЧОВЕШКИТЕ РЕСУРСИ”  
Подкрепа за развитието на докторанти, пост-  
докторанти, специализанти и млади учени”,  
ДОГОВОР BG051PO001-3.3.04/58 от 2009**

# Изолиране и пречистване на ДНК от бактерии

Иван Иванов,  
Национален Център по Заразни  
и Паразитни Болести

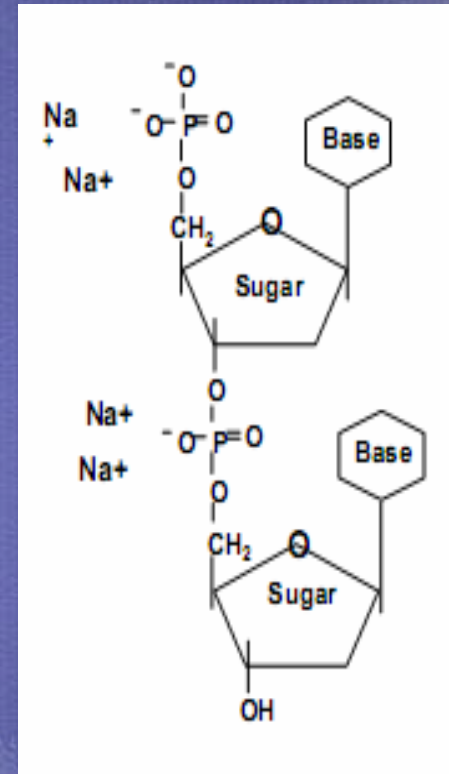


# Защо е важно изолирането на ДНК ?

- Молекулярна биология
- Молекулярна диагностика
- Криминалистика
- Фундаментални проучвания  
върху функции на гени
- Секвениране на геноми и др.

# Стабилност на ДНК

- **Стабилен биополимер**
  - температури до 100°C
  - рН 5 – 9
  - слаби киселини и основи
- **Разгражда се при :**
  - автоклавиране 121°C/
  - 1М НСІ или 2М NaOH
  - NaClO (белина)
  - Йонизиращи и микровълнови лъчения (UV модифицира тимина)
  - **Нуклеази !**

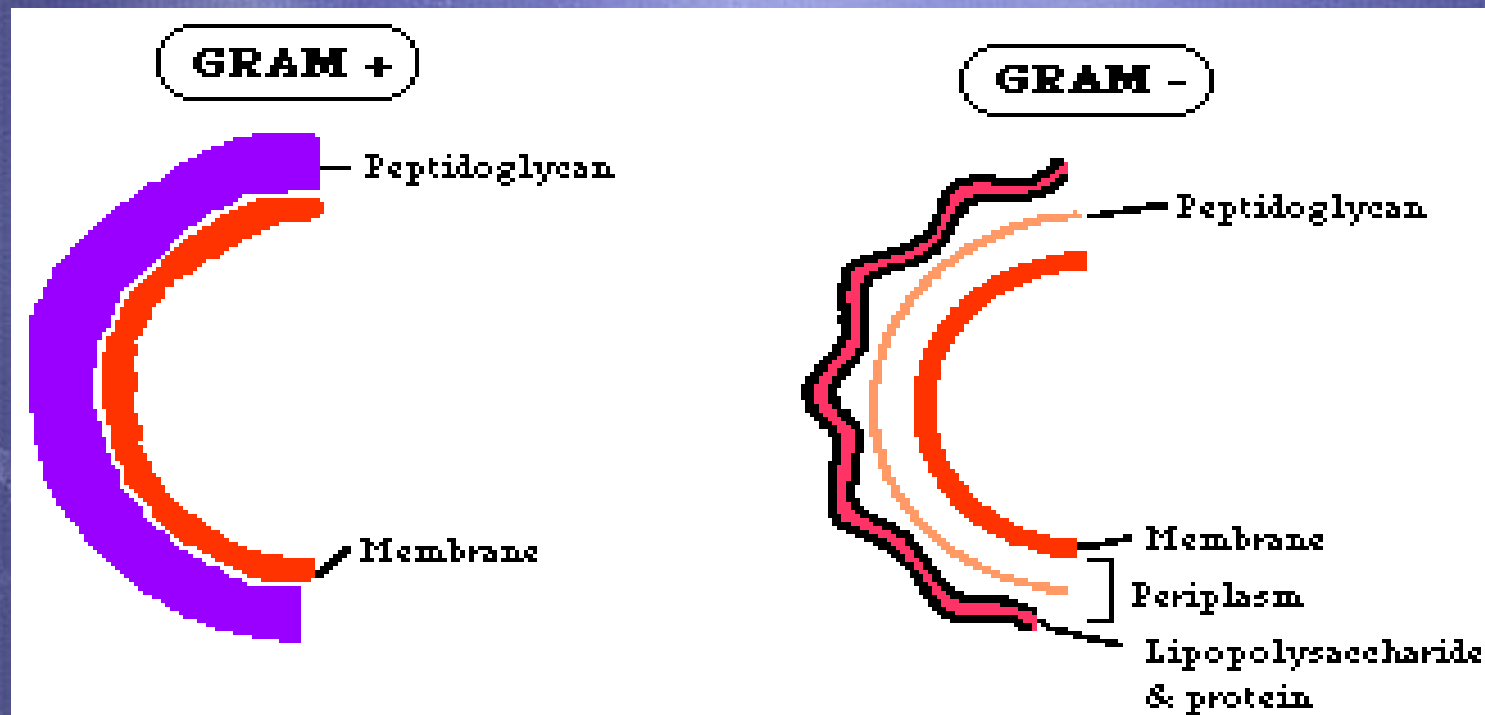


# Основни етапи

1. Разкъсване на клетъчната обвивка/  
стена
2. Лизис на клетъчни компоненти
3. Разделяне на протеини, въглехидрати  
и липиди (пречистване)
4. Допълнително пречистване от  
нискомолекулни съединения и  
концентриране на ДНК

# Разкъсване на клетъчната обвивка

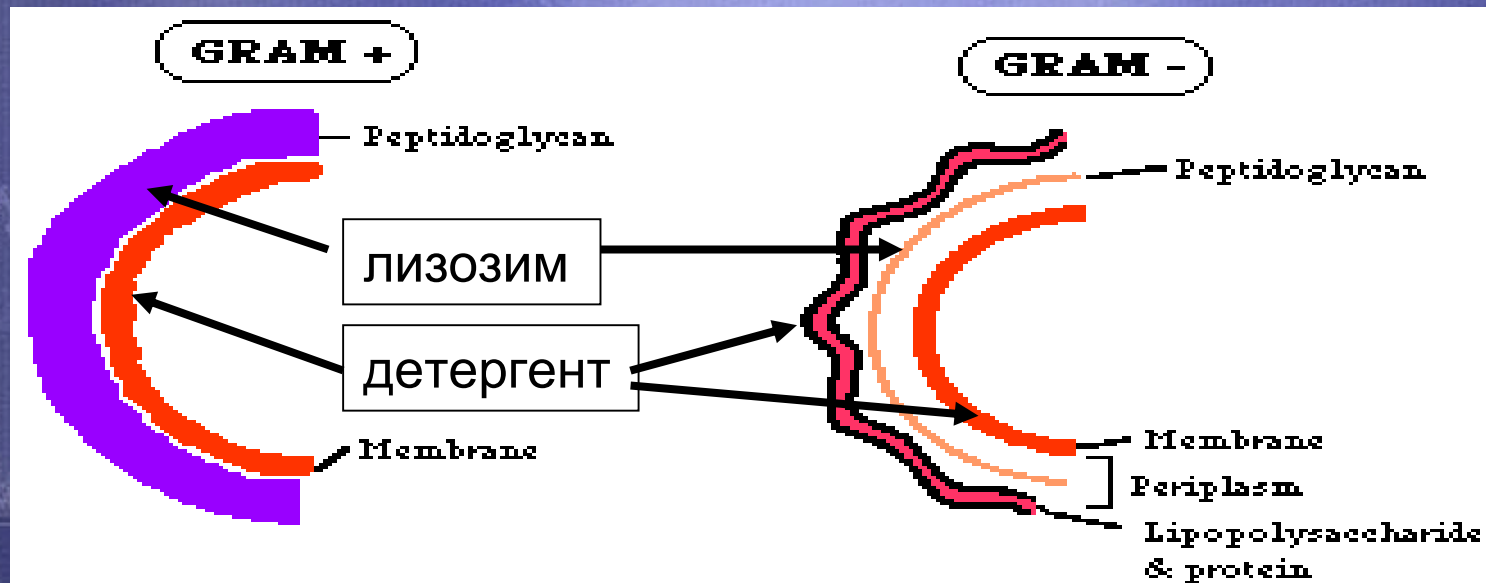
- Бактериите притежават клетъчна стена !



# Разкъсване на клетъчната обвивка

- **Методи**

- **Физични** – ултразвук, загряване, осмотичен шок, механично разбиване (bead-beating) и др.
- **Химични** – гуанидинови соли + детергенти
- **Ензимни** – лизозим, лизостафин + протеази



# Лизис на клетъчните компоненти

- Лизиращи буфери
  - ДНК е в комплекси с белтъци !
  - протеинази (протеиназа К) + редуциращи агенти
  - детергенти + соли + буфери

Протеини → пептиди

Липиди → мастни киселини + полиоли

Въглехидрати → олигозахариди

# Пречистване

- **Класически методи**

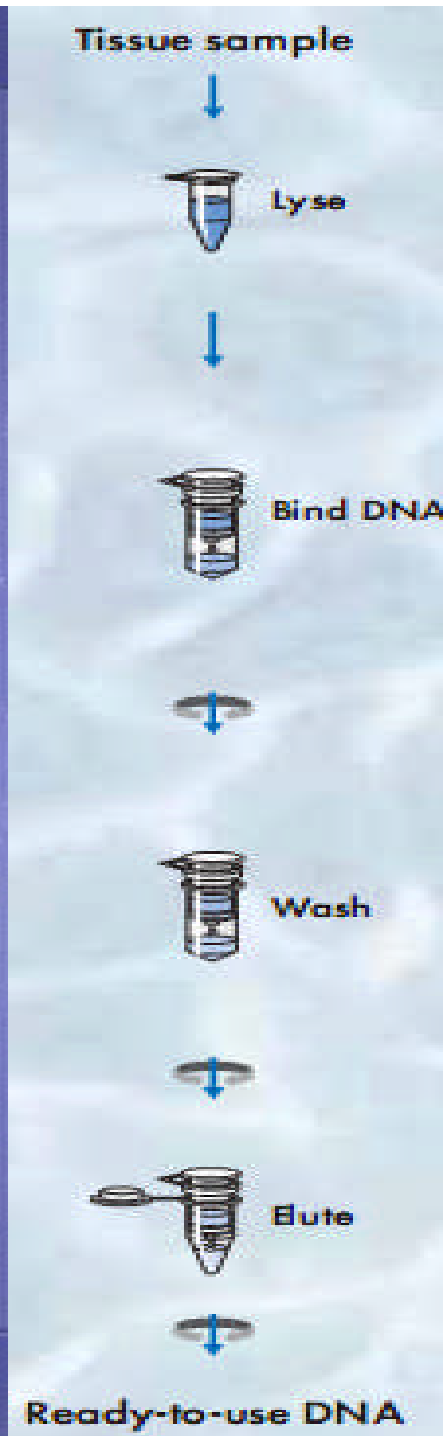
- екстракция с орган. разтворители (фенол/ хлороформ)
- изсолване с NaCl
- Селективна преципитация на ДНК с етанол / изопропанол



- **Съвременни методи**

- свързване на ДНК със SiO частици в присъствие на гуанидинови соли (Boom et al. 1990)
- търговски китове на базата на хроматографски колони
- **Свързване на ДНК с парамагнитни частици и разделяне в магнитно поле**

# Фенол/ хлороформна екстракция



Търговски китове  
на базата на SiO  
хроматографски колони

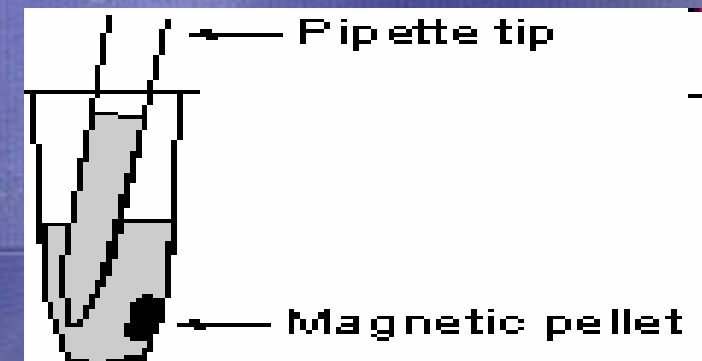
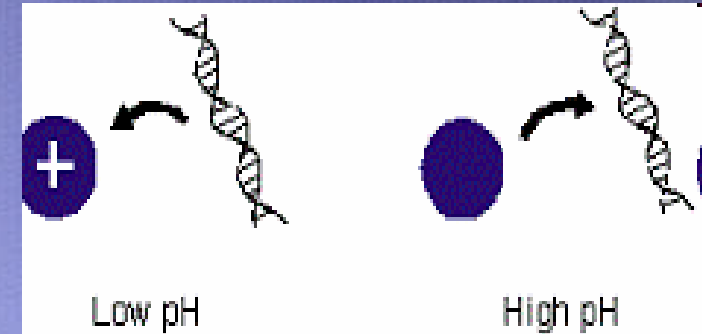
# Магнитно разделяне

- **Парамагнитни частици**

- рН зависимо йонно взаимодействие с ДНК

- Отмиване на лизираните клетъчни компоненти

- елуиране на ДНК в буфер с рН ~8



# Допълнително пречистване и концентриране

- Важно за съхранение на ДНК
- Селективна преципитация
  - селекция по големина на полинуклеотиди  
(алкални ацетати + PEG 6000, 8000 и тн.)
- Ультрафилтрация / диализа (филтри)
- Дехидратация с n-бутанол/ 2-бутанол

# Съхранение на ДНК

- Лиофилизация
- Сух преципитат
- Разтворена в буфер с рН ~8
- Фризер –  $80^{\circ}\text{C}$  за предпочитане  
( $-20^{\circ}\text{C}$  по-често)
- В зависимост от пречистването –  
от 1 до 20 години

Благодаря за  
вниманието !