

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΣΚΗΣΗ 10

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ ΑΠΟ ΦΥΤΑ

ΥΛΙΚΑ που θα χρειαστούν

- A] Πάγος τριμμένος.
- B] Ένα Ακτινίδιο.
- Γ] Υγρό πιάτων (όχι συμπυκνωμένο) 10 mL.
- Δ] Μαγειρικό αλάτι 3 gr.
- Ε] Απιονισμένο νερό 100 mL.
- Ζ] Αιθανόλη 6 ml παγωμένη (-20 °C).
- Η] Διάλυμα ενζύμου (πρωτεΐνάση 0,1 gr/100 mL ή πεψίνη 1 gr /100 mL) .

ΕΚΤΕΛΕΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

- A] Σε ποτήρι ζέσεως βάζουμε υγρό πιάτων ,μαγειρικό αλάτι και απιονισμένο νερό μέχρι 100 mL.
- B] Κόβουμε μισό ακτινίδιο σε κομμάτια το λιώνουμε στο γουδί και το σουρώνουμε.
- Γ] Παίρνουμε 10 mL από το (σουρωμένο) ζουμί του ακτινιδίου και το ρίχνουμε σε 10 mL του αρχικού μείγματος (υγρό πιάτων ,μαγειρικό αλάτι και απιονισμένο νερό).
- Δ] Τοποθετούμε το τελικό μείγμα σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 60 °C ,για 15 λεπτά.
- Ε] Τοποθετούμε το μείγμα σε τριμμένο πάγο για 10 λεπτά ,ανακατεύοντας συχνά .
- Ζ] Αφού διηθήσουμε το μείγμα (προαιρετικά) ,αφαιρούμε με σύριγγα ή με πιπέτα 10 mL και τα μεταφέρουμε σε δοκιμαστικό σωλήνα.
- Η] Προσθέτουμε 2-3 σταγόνες διαλύματος του ενζύμου (πεψίνης) και ανακατεύουμε ελαφρά .
Προσθέτουμε παγωμένη αιθανόλη (- 20 ° C) , μέχρι να σχηματισθεί ένα στρώμα επάνω από το διάλυμα .
- Θ] Τοποθετούμε τον δοκιμαστικό σωλήνα σε στήριγμα και περιμένουμε 2-3 λεπτά .
- Ι] Τα νουκλεϊκά οξέα συγκεντρώνονται στην επιφάνεια επαφής διαλύματος /αιθανόλης και αναδύονται.
- K] Συλλέγουμε με την γυάλινη ράβδο.

Θ Ε Ω Ρ Η Τ Ι Κ Η Ε Ξ Η Γ Η Σ Η Α Π Ο Μ Ο Ν Ω Σ Η Σ D N A

Η απομόνωση του D.N.A. δεν είναι κάτι απλό. Υπάρχουν διάφορα πρωτόκολλα για τα πειράματα απομόνωσης του D.N.A. .Μερικά φαίνονται απλά. Υπάρχουν επίσης διαφορές ανάλογα με το είδος ιστού, φυτικός (τομάτα, κρεμμύδι, μπανάνα, ακτινίδιο, φράουλα) ή ζωικός (επιθηλιακά κύτταρα από την στοματική μας κοιλότητα, θύμος αδένας, ήπαρ από κοτόπουλο ή μοσχάρι). Σε κάθε περίπτωση απαιτείται να κατανοήσουμε σαφώς το που βρίσκεται το D.N.A., τη δομή του μορίου του, με ποιες τεχνικές και με ποια υλικά επιδιώκουμε την απομόνωσή του, έτσι ώστε το πείραμα να είναι διδακτικά χρήσιμο για τους μαθητές.

- **Απορρυπαντικό:** Για να σπάσουν οι μεμβράνες των κυττάρων, στις οποίες επικρατούν οι υδρόφοβοι δεσμοί των φωσφολιπιδίων. Η παρουσία των ιόντων Na^+ βοηθά ώστε το σπάσιμο αυτό να γίνεται όχι μηχανικά (βίαια), αλλά χημικά με το σπάσιμο των ηλεκτροστατικών δεσμών μεταξύ πρωτεϊνών και DNA με αποτέλεσμα την καταβύθιση των πρωτεϊνών.
- **Θέρμανση:** Διευκολύνεται το σπάσιμο των κυττάρων, γιατί αυξάνει η διαδικασία της λύσης των κυτταρικών τους μεμβρανών. Παράλληλα οι νουκλεάσες (εξωνουκλεάσες και ενδονουκλεάσες) των κυττάρων αδρανοποιούνται λόγω μετουσίωσης και δεν δρουν εναντίον των ινιδίων των νουκλεϊκών οξέων για να τα κόψουν σε μικρότερα κομμάτια.
- **Πεψίνη:** Είναι ένα ένζυμο που πέπτει τις πρωτεΐνες σε όξινο περιβάλλον (όπως του στομάχου) με βέλτιστο $\text{pH}=2$. Είναι μία όξινη πρωτεάση που παρουσιάζει δύο καταλυτικά- ενζυμικά κέντρα . Βοηθά στην απομάκρυνση των ιστονών από τα μόρια των νουκλεϊκών οξέων και αποικοδομεί τα ένζυμα που μπορεί να διασπάσουν το DNA. Φυλάγεται σε ψυγείο (θερμοκρασία 4°C).
- **Αλκοόλη:** Το DNA δεν είναι διαλυτό στην αιθανόλη και αναδύεται. Η διαλυτότητα εξαρτάται από την θερμοκρασία γι' αυτό χρησιμοποιούμε παγωμένη αλκοόλη. Απομακρύνει μόρια νερού από τον υδρόφιλο σκελετό των μορίων DNA (σταδιακή αφυδάτωση), γι' αυτό είναι προτιμότερη η ισοπροπυλική από την αιθυλική γιατί υδρολύει ευκολότερα. Με αυτόν τον τρόπο απομονώνεται το νουκλεϊκό οξύ στα όρια των δύο φάσεων «ψαρεύοντάς» το από την φάση του νερού προς την φάση της αλκοόλης.
- **Φιλτράρισμα:** Με το φιλτράρισμα στο φίλτρο κατακρατούνται τα θραύσματα μεμβρανών, οργανιδίων και στο διήθημα περνούν μόνο μόρια. Γι αυτό μπορούμε να το επαναλάβουμε ώστε να έχουμε μεγαλύτερη καθαρότητα στο τελικό προϊόν.
- **RNA:** Το ποσό του RNA κατά την απομόνωση είναι μικρό διότι αυτό σχηματίζει μικρά μόρια και δεν μπορούν να τυλιχτούν γύρο από το ραβδάκι. Σε «Πειραματική Βιοχημεία» των εκδόσεων ΚΡΗΤΗΣ σαν ένζυμο απομόνωσης του RNA αναφέρεται η πυρονίνη και όχι η πεψίνη.
- **Μπλέντερ (ή λιώσιμο) :** Ομογενοποίηση με το μηχανικό σπάσιμο των μεμβρανών (κυτταρική + πυρηνική + κυτταρικό τοίχωμα) .Πρέπει να διατηρείται μέτρια ταχύτητα για λίγα δευτερόλεπτα ,γιατί υπάρχει κίνδυνος να σπάσουμε και το ίδιο το DNA.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Για την απομόνωση των νουκλεϊκών οξέων, με αυτή την τεχνική γίνεται χρήση του ιώδους χαρακτήρα του νουκλεϊκού οξέως. Η εκχύλιση με άλατα και οι ποσότητες της αλκοόλης που χρησιμοποιήθηκαν είναι επιλεκτικές κατά κάποιο τρόπο για DNA και όχι για RNA.

Ένα δεύτερο στοιχείο είναι κατά την καταβύθιση με αλκοόλη και το ακόλουθο περιτύλιγμα των νηματοειδών μορφών με το ραβδάκι βεβαιώνει την ύπαρξη ενός σχετικά καθαρού DNA και όχι RNA.

Βιβλιογραφία στην απομόνωση DNA

- 1) Biology in laboratory ,3rd edition , freeman and company ,New York USA
- 2) Arian Henn (2006) Το τέλος της παντοκρατορίας των γονιδίων .Leader Books.
- 3) Evelyn Fex Keller (2004) .Ο αιώνας του γονιδίου .Εκδόσεις Τραυλός.
- 4) Μισέλ Μοράνζ (1999) .Ιστορία της Μοριακής Βιολογίας .Εκδόσεις Καστανιώτη.
- 5) Rose stever (2005) .Μονοπάτια της ζωής. Βιολογία , ελευθερία και ντετερμινισμό. Εκδόσεις Κάτοπτρο.
- 6) Lewonun Richard . Δεν είναι απαραίτητα έτσι .Το όνειρο του ανθρώπινου γονιδιώματος και άλλες πλάνες. Εκδόσεις Κάτοπτρο.
- 7) Τεχνολογίες αιχμής και η συμβολή τους στο μέλλον των βιοεπιστημών. Υλικό από τα επιμορφωτικά σεμινάρια Ινστιτούτου Παστέρ , Δεκέμβριος 2006.(επιμέλεια Μπολέτη Χ., Χαραλάμπους Σ.)
- 8) Εργαστηριακές Προτάσεις Σχολικής Συμβούλου ΠΕ04 Α΄ Αθήνας Βασιλοπούλου Μαρίας (mariavasilop@yahoo.gr)
- 9) **Εργαστηριακές Προτάσεις Σχολικού Συμβούλου ΠΕ04 Β΄ Αθήνας Σαλαμαστράκη Σ.**

Δικτυακοί τόποι (Internet)

<http://learn.genetics.utah.edu/units/activities/extraction>

<http://www.embl.de/training/science/teachers.html>

<http://www.ginesernes-laber.de>

<http://raven.nmnh.utah.edu/new/projects/kitchenDNA.html>

(Find DNA in your kitchen. Σελ. 24 Βιολογία Θετικής)