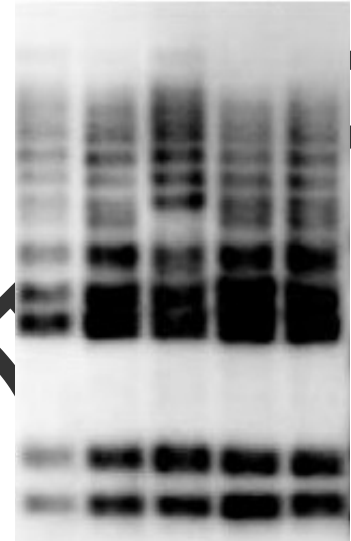


2η Εργαστηριακή Άσκηση: Απομόνωση DNA

1. **Στόχος της άσκησης:** Είναι η εξοικείωσή σου:

- α). με το μακρομόριο του DNA, σε μορφή που μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο σε εκπαιδευτικές όσο και ερευνητικές εφαρμογές (με κατάλληλες τροποποιήσεις των μεθόδων),
- β). με τις τεχνικές της Μοριακής Βιολογίας.

2. **Θεωρητικά στοιχεία:** Το DNA είναι η απαραίτητη πρώτη ύλη των περισσότερων ερευνών, μελετών και εφαρμογών της Μοριακής Βιολογίας, Γενετικής Μηχανικής (π.χ. ανασυνδυασμένο DNA), Ιατροδικαστικής (π.χ. αποτύπωμα DNA), Ιατρικής (μέθοδοι διάγνωσης ασθενειών) κ.λ.π. Για να εφαρμόσουμε οποιαδήποτε τεχνική θα πρέπει πρώτα να το απομονώσουμε σε καθαρή μορφή, απαλλαγμένο από RNA, πρωτεΐνες, λιπίδια ή υδατάνθρακες. Η απομόνωση σε καθαρή μορφή είναι απαραίτητη προϋπόθεση για κάθε παραπέρα διαδικασία. Φυσικά για κάθε διαφορετικό τύπο DNA (χρωμοσωμικό, πλασμιδιακό, μιτοχονδριακό,...) υπάρχουν και διαφορετικές μέθοδοι απομόνωσης. Σε όλες όμως μπορούμε να εντοπίσουμε κοινά στοιχεία.



Gel ηλεκτροφόρησης DNA

Στη συγκεκριμένη άσκηση θα χρησιμοποιήσουμε σαν υλικό το εκχύλισμα από κύτταρα μπανάνας, για ευκολία και περιορισμό της χρονικής διάρκειας (περίπου 40').

- Πρέπει να σπάσουν οι κυτταρικές μεμβράνες ώστε να απελευθερωθεί το DNA.
- Πρέπει να διαχωριστεί από τα άλλα μακρομόρια (πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες, λιπίδια).

Διευκρινήσεις για το λόγο που χρησιμοποιούμε ορισμένα υλικά

- **Μπανάνα:** η επιλογή της γίνεται επειδή οι ιστοί της είναι αρκετά τρυφεροί και μπορούν εύκολα να εκχυλιστούν τα νουκλεϊκά οξέα
- **Άλατα:** για κατακρήμνιση (βύθιση και διαχωρισμό). Επιπλέον δίνει τη δυνατότητα στις αλυσίδες του DNA να έρθουν πιο κοντά και να συσσωματωθούν.
- **Απορρυπαντικό:** διαλύει τα λιπίδια που συγκρατούν τις μεμβράνες και έτσι απελευθερώνονται τα νουκλεϊκά οξέα στο διάλυμα
- **Ένζυμα υγρού φακών:** διάσπαση πρωτεϊνών που βρίσκονται σε μεμβράνες ή στα νουκλεϊκά οξέα.
- **Αλκοόλη:** κατακρημνίζει το DNA. Το DNA δεν είναι διαλυτό στην αλκοόλη. Όταν η αλκοόλη προστεθεί στο διάλυμα, τα συστατικά του διαλύματος εκτός από DNA, μένουν στο διάλυμα ενώ το DNA κατακρημνίζεται
- **Παγωμένη αλκοόλη:** εμποδίζει τη διάλυση του DNA, όπως θα γινόταν αν βρισκόταν σε θερμοκρασία δωματίου. Η αλκοόλη απομακρύνει τα άλατα και βοηθάει στη δημιουργία ιζήματος DNA και όχι στη διάλυσή του.

Προσοχή!!! Πρέπει να **αποφύγουμε** να σπάσουμε:

- Τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς (με νουκλεάσες, ή με θερμοκρασία >90 °C)

- Τους υδρογονικούς δεσμούς (με αλλαγή pH, θερμοκρασία >80 °C) και την
- Διπλή αλυσίδα του DNA (λόγω μηχανικής καταπόνησης).

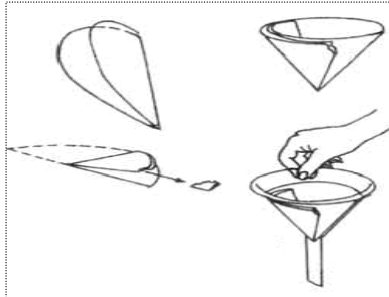
A. Απομόνωση DNA από εκχύλισμα φυτικών ιστών.

3. Όργανα και Υλικά που θα χρειαστούν

- 1 μπανάνα
- απιονισμένο νερό
- 1 κουταλιά υγρό απορρυπαντικό
- υγρό φακών (προαιρετικά)
- μαγειρικό αλάτι ~5g
- παγωμένη αιθανόλη 95°, ή (ισοπροπανόλη)
- 2 ποτήρια ζέσης 100mL
- στήριγμα δοκιμαστικών σωλήνων
- 1 δοκιμαστικός σωλήνας
- πλαστική πιπέτα (ή σύριγγα των 10mL)
- ψυγείο ή δοχείο με παγάκια
- πλαστικά κουτάλια
- φίλτρο καφέ
- ξύλινο καλάμακι ή πιπέτα Pasteur της οποίας το κάτω άκρο έχει καμφθεί
- (Σωληνάκια *Eppendorf* αν υπάρχουν)

4. Πειραματική Διαδικασία

1. Σε μπλέντερ προσθέστε 3-4 κομμάτια της μπανάνας (περίπου τη μισή) και 100mL απιονισμένο νερό 45°C.
2. Σε ένα άλλο ποτήρι διαλύστε περίπου 1 κουταλάκι του γλυκού αλάτι σε 20ml απιονισμένο νερό και προσθέστε το στο μπλέντερ.
3. Αναμείξτε στο μπλέντερ για 15s με προσοχή ώστε να ομογενοποιήσετε το μίγμα.
4. Τοποθετούμε το φίλτρο του καφέ στο χονί αφού το έχουμε υγράνει με λίγο νερό, προσθέτουμε το ομογενοποιημένο μίγμα από το μπλέντερ και συλλέγουμε το φιλτραρισμένο χυμό σε μια κωνική φιάλη. Πετάμε το φίλτρο με τον πολτό μπανάνας.
5. Προσθέτουμε 1 κουταλάκι υγρό απορρυπαντικό στο φιλτραρισμένο χυμό και αναδεύουμε για 4-5 λεπτά. Η ανάδευση με το κουτάλι πρέπει να γίνεται προσεκτικά ώστε να μη σχηματιστεί αφρός.
6. Προαιρετικά μπορείτε να προσθέσετε 1-2 σταγόνες από το υγρό των φακών επαφής στο νέο διάλυμα.
7. Τοποθετούμε το διάλυμα σε δοκιμαστικό σωλήνα μέχρι τα του όγκου του.
8. Προσθέτουμε προσεκτικά παγωμένη αλκοόλη, στην πλευρά του σωλήνα, έτσι ώστε η αλκοόλη να διατηρηθεί σε ένα στρώμα επάνω από το χυμό (μπορούμε να διατηρούμε την αλκοόλη σε ένα φελιζόλ με πάγο ή παγάκια).
9. Αφήνουμε το διάλυμα σε ηρεμία για 2-3 λεπτά. Παρακολουθούμε την συγκέντρωση των νουκλεϊκών οξέων (DNA + RNA) στο στρώμα της αλκοόλης. Μια λευκή ουσία θα γίνει ορατή στη μεσόφαση όπου τα δύο υγρά επικοινωνούν.
10. Τα σχηματιζόμενα νουκλεϊκά οξέα μπορούν να απομακρυνθούν από το σωλήνα με μία πιπέτα *Pasteur*, ή ένα καλάμακι από σουβλάκι.
11. Μετά το πείραμα, τα εκχυλισμένα νουκλεϊκά οξέα αν θέλετε μπορείτε να το μεταφέρετε προσεκτικά σε μικρά σωληνάκια *eppendorf* τα οποία περιέχουν αλκοόλη και να τα πάρετε μαζί σας.



B. Απομόνωση DNA από ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα (στοματικού βλεννογόνου)

1. Όργανα και Υλικά

1. Τέσσερα ποτήρια ζέσεως των 50mL.
2. μαγειρικό αλάτι
3. κουταλάκια 2
4. πιπέττες *Pasteur* 2
5. σαπυνοδιάλυμα
6. παγωμένη αλκοόλη 95°
7. ξύλινο καλαμάκι

2. Πειραματική διαδικασία

- Σε **ένα** ποτήρι ζέσεως 50mL αναμίξτε μισό ποτήρι νερό με μία κουταλιά μαγειρικό αλάτι.
- Σε ένα **δεύτερο** ποτήρι αναμίξτε 3 κουταλιές νερό με 1 κουταλιά υγρού πιάτων.
- Κάντε πλύσεις στο στόμα σας με μία κουταλιά αλατόνερο από το ποτήρι 1 για περίπου 30s. Φτύστε σε ένα **τρίτο** ποτήρι.
- Πάρτε μια κουταλιά από το τρίτο ποτήρι και προσθέστε τη στο **τέταρτο** ποτήρι μαζί με 1 κουταλιά σαπυνοδιάλυμα από το δεύτερο ποτήρι και αναδεύστε απαλά για ένα περίπου λεπτό.
- Σε **ένα δοκιμαστικό** σωλήνα προσθέστε 5mL από το ποτήρι 4 και στη συνέχεια ακουμπώντας στα τοιχώματα του σωλήνα, προσθέστε σιγά σιγά με πλαστική πιπέτα, ίση ποσότητα παγωμένης αλκοόλης.
- Αφήστε το μείγμα ακίνητο για 2-3min.
- Μπορείτε να συλλέξετε το DNA από τη στιβάδα της αιθανόλης συστρέφοντάς το γύρω από ένα ξύλινο καλαμάκι ή μια γυάλινη ράβδο.

Παρατήρηση: Η ποσότητα του DNA που θα απομονωθεί από τα επιθηλιακά κύτταρα είναι πολύ λιγότερη από αυτή της μπανάνας. (γιατί;)



Φύλλο Εργασίας

Να απαντήσετε στις παρακάτω ερωτήσεις.

1. Να περιγράψτε την εμφάνιση του DNA που απομονώσατε.

.....
.....
.....
.....
.....

2. Για ποιό λόγο πολτοποιούμε και μετά φιλτράρουμε το δείγμα;

.....
.....
.....
.....
.....

3. Τα ένζυμα από το υγρό των φακών που χρησιμοποιούμε διασπούν πρωτεΐνες. Γιατί προσθέσαμε αυτά τα ένζυμα στο μείγμα;

.....
.....
.....
.....
.....

4. Να ονομάσετε τα νουκλεϊκά οξέα που εμφανίζονται στην επιφάνεια επαφής διαλύματος – αλκοόλης. Μπορούν με αυτή τη μορφή να χρησιμοποιηθούν για περαιτέρω εργασίες μοριακής βιολογίας;

.....
.....
.....
.....
.....

5. Σε ποιες περιπτώσεις νομίζετε ότι είναι απαραίτητη η απομόνωση DNA;

.....
.....
.....
.....
.....