

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΑΠΟ ΦΥΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ (ΜΠΑΝΑΝΑ)

Στόχοι της εργαστηριακής άσκησης

- Η εξοικείωση με τη διαδικασία απομόνωσης του DNA από κύτταρα φυτικού οργανισμού.
- Η διαπίστωση ότι ορισμένα πειράματα μπορούν να πραγματοποιηθούν πολλές φορές με απλά υλικά καθημερινής χρήσης.

Απαιτούμενα όργανα	Απαιτούμενα υλικά – αντιδραστήρια
Πλαστικά σακουλάκια	Μπανάνες μεσαίου μεγέθους
Ποτήρια ζέσεως	Απιονισμένο νερό
Σουρωτήρια	Απορρυπαντικό (όχι συμπυκνωμένο)
Εργαστηριακή ράβδος ανάδευσης	Αλάτι
	Παγωμένη ισοπροπυλική αλκοόλη

Πειραματική διαδικασία

1. Εργαζόμαστε σε ομάδες.
2. Κάθε ομάδα παίρνει μια μπανάνα μεσαίου μεγέθους και την κόβει σε πέντε κομμάτια.
3. Κάθε μέλος μίας ομάδας παίρνει ένα κομμάτι μπανάνας και το εισάγει σε ένα πλαστικό σακουλάκι μαζί με 20 ml διαλύματος απορρυπαντικού – απιονισμένου νερού 1:1.
4. Ακολουθεί ομογενοποίηση μέσα στο σακουλάκι.
5. Κάθε ομάδα συγκεντρώνει το εκχύλισμα από τα 5 σακουλάκια σε ένα ποτήρι ζέσεως.
6. Ακολουθεί φιλτράρισμα του εκχυλίσματος με σουρωτήρι σε ένα δεύτερο ποτήρι ζέσεως.
7. Ακολουθεί προσθήκη μίας κουταλιάς αλατιού στο φιλτραρισμένο εκχύλισμα και προσεκτική ανάδευση.
8. Ακολουθεί προσθήκη παγωμένης ισοπροπυλικής αλκοόλης σε ένα τρίτο ποτήρι ζέσεως.
9. Ένα μέλος από κάθε ομάδα χύνει προσεκτικά το εκχύλισμα στα εσωτερικά τοιχώματα του ποτηριού ζέσεως που περιέχει την αλκοόλη.
10. Τα νήματα DNA παρατηρούνται στη φάση της ισοπροπυλικής αλκοόλης.

Παρατήρηση

Υπάρχουν διάφορα πρωτόκολλα απομόνωσης του DNA από φυτικούς ιστούς διαφόρων οργανισμών π.χ. αρακάς, κρεμμύδι, ακτινίδιο, φράουλα κ.λπ. Έχοντας γνώση της δομής των φυτικών κυττάρων καθώς και του μορίου του DNA, μπορούμε να κατανοήσουμε καλύτερα τις τεχνικές που χρησιμοποιούμε για να το απομονώσουμε.

Θεωρητικές επισημάνσεις

1. Η **ομογενοποίηση** έχει ως στόχο το σπάσιμο των κυτταρικών και πυρηνικών μεμβρανών καθώς και του κυτταρικού τοιχώματος των φυτικών κυττάρων με μηχανικό τρόπο.
2. Το **απορρυπαντικό** διασπά τα λιπίδια των κυτταρικών και των πυρηνικών μεμβρανών των κυττάρων, στις οποίες επικρατούν οι υδρόφοβοι δεσμοί των φωσφολιπιδίων.
3. Το **αλάτι** επιταχύνει την παραπάνω διαδικασία καταστροφής των μεμβρανών. Επιπλέον τα θετικά ιόντα Na^+ σπάζουν τους ηλεκτροστατικούς δεσμούς μεταξύ των πρωτεϊνών και του DNA

και δημιουργούν ένα κέλυφος γύρω από τις αρνητικά φορτισμένες ομάδες του DNA. Αυτό το καθιστά δυσδιάλυτο στο νερό και έτσι ορατό.

4. Με τη **διήθηση (φιλτράρισμα)** κατακρατούνται στο σουρωτήρι τα θραύσματα μεμβρανών και οργανιδίων ενώ στο διήθημα περνούν μόνο μόρια ώστε να έχουμε μεγαλύτερη καθαρότητα στο τελικό προϊόν.
5. **Αλκοόλη:** απομακρύνει μόρια νερού από τον υδρόφιλο σκελετό των μορίων DNA (σταδιακή αφυδάτωση) με αποτέλεσμα αυτά να συγκεντρώνονται στην αλκοολική φάση. Με αυτό τον τρόπο απομονώνεται το νουκλεϊκό οξύ στα όρια των δύο φάσεων, ενώ τα υπόλοιπα μόρια είναι διαλυμένα στο νερό. Οι δύο φάσεις δημιουργούνται γιατί η παγωμένη αλκοόλη έχει μικρότερη πυκνότητα από το νερό.
6. Πριν την προσθήκη του διηθήματος στην αλκοόλη, θα μπορούσαμε να προσθέσουμε 2-3 σταγόνες διαλύματος **πρωτεΐνάσης ή πεψίνης** και να αναδεύσουμε ήπια με στόχο να αποικοδομήσουμε τις πρωτεΐνες, τόσο τις δομικές (ιστόνες) όσο και τα ένζυμα που μπορεί να διασπάσουν το DNA.

Φύλλο Εργασίας

1. Σε τι νομίζετε ότι συνεισφέρει το υγρό πιάτων (σαπούνι) στη διαδικασία απελευθέρωσης του DNA στο διάλυμα;
.....
.....
.....
.....
2. Για ποιο λόγο, κατά τη γνώμη σας, φιλτράρουμε το διάλυμα των σπασμένων κυττάρων; Τι κατακρατείται στο σουρωτήρι και τι περνάει στο διήθημα;
.....
.....
.....
.....
.....
3. Γιατί το DNA είναι ορατό μετά την προσθήκη της αλκοόλης;
.....
.....
.....
.....
.....
4. Γιατί πρέπει να αδρανοποιηθούν οι νουκλεάσες των κυττάρων στη διαδικασία απομόνωσης του DNA;
.....
.....
.....
.....
.....