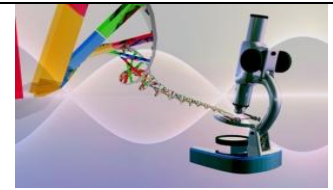




1^η ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΣΚΗΣΗ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΑΠΟ ΦΥΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ



ΒΙΟΛΟΓΙΑ Γ' ΓΥΜΝΑΣΙΟΥ

Επιμέλεια: Βολακάκης Γιάννης, Βιολόγος

1) ΣΚΟΠΟΣ - ΣΤΟΧΟΙ

Σκοπός της παρούσας εργαστηριακής άσκησης είναι να γίνει δυνατή η απομόνωση και η μακροσκοπική παρατήρηση του DNA από φυτικά κύτταρα και μάλιστα μέσω απλών διαδικασιών και με τη βοήθεια υλικών καθημερινής χρήσης. Οι στόχοι που επιθυμούμε να επιτύχουμε έχουν να κάνουν με την πραγματοποίηση πειραμάτων με απλά υλικά, την εξοικείωση με διαδικασίες εργαστηριακές και τέλος την «απομυθοποίηση» του DNA, δηλαδή τη διαπίστωση ότι βρίσκεται «παντού» και είναι «πολύ»!

2) ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

Σήμερα όλοι γνωρίζουμε ότι το γενετικό όλων των οργανισμών (με εξαίρεση κάποιους ιούς) είναι το DNA. Το DNA δεν είναι τίποτε άλλο από κωδικοποιημένες πληροφορίες οι οποίες δίνουν την οδηγία για τη σύνθεση των πρωτεϊνών. Στη διαδικασία αυτή συμμετέχει και το RNA.

Το DNA εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα των ευκαρυωτικών κυττάρων. Μικρές ποσότητες υπάρχουν στα μιτοχόνδρια και στους χλωροπλάστες. Επομένως, στην προσπάθεια απομόνωσης των μορίων DNA από φυτικά κύτταρα θα πρέπει να «ελευθερώσουμε» τα μόρια DNA από τα υπόλοιπα κυτταρικά τμήματα.

Θα πρέπει, επομένως, να σπάσει το κυτταρικό τοίχωμα αλλά και να διαλυθούν οι μεμβράνες που περικλείουν το γενετικό υλικό: η πλασματική μεμβράνη (απλή στοιχειώδης) αλλά και η πυρηνική μεμβράνη (διπλή στοιχειώδης). Σε μια πρώτη φάση η πολτοποίηση βοηθά στο να σπάσουν κάποια κύτταρα ή να ελαττωθεί η μεταξύ τους σύνδεση. Στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας υγρό πιάτων, διαλύονται οι φωσφολιπιδικής φύσεως μεμβράνες του κυττάρου και απελευθερώνεται το DNA.

Το DNA όμως είναι συνδεδεμένο με πρωτεΐνες (π.χ. ιστόνες, μη ιστόνες). Για να αποκτήσουμε «καθαρό DNA» θα πρέπει να διασπάσουμε τις πρωτεΐνες αυτές. Κάτι τέτοιο επιτυγχάνεται με τη δράση πρωτεολυτικών

ενζύμων. Στο πείραμά μας, τα ένζυμα αυτά περιέχονται στο ακτινίδιο. Σε διαφορετική περίπτωση χρησιμοποιούμε ένζυμο πεψίνη.

Για την εκχύλιση του DNA όμως χρησιμοποιήθηκε και αλάτι. Τα ιόντα Na^+ που προκύπτουν από τη διάλυση του αλατιού επιδρούν με τις αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες του σκελετού του DNA και έτσι βοηθούν στη συσσωμάτωση του μορίου (δηλ. παίρνουμε πιο εμφανή αποτελέσματα).

Το DNA επομένως θα βρίσκεται σε διαλυτή μορφή μαζί με κυτταρικά υπολείμματα και άλλα προϊόντα που δεν επιθυμούμε. Η διήθηση βοηθά στο να απομακρυνθούν αυτά που δε χρειαζόμαστε.

Τέλος, η προσθήκη της παγωμένης αιθανόλης στο διήθημα, βοηθά στο να πάρουμε ένα ορατό αποτέλεσμα, αφού το DNA είναι αδιάλυτο στην αλκοόλη.

2) ΟΡΓΑΝΑ ΚΑΙ ΟΥΣΙΕΣ ΠΟΥ ΘΑ ΧΡΕΙΑΣΤΟΥΜΕ

1. Ένα ακτινίδιο



2. Υγρό πιάτων (όχι συμπυκνωμένο), περίπου 10 mL ή 2 κουταλιές γλυκού

3. Αλάτι, περίπου 3g ή 1 κουταλιά γλυκού

4. 100 mL νερό

5. Παγωμένη αιθανόλη (την έχουμε ήδη στην κατάψυξη)

6. Βραστήρα ή οποιαδήποτε συσκευή για θέρμανση νερού

7. φίλτρο καφέ

8. Γυάλινα ή πλαστικά μπολ

9. Μαχαίρι

10. Οδοντογλυφίδα ή ξυλάκια για σουβλάκι

11. Ποτήρια ζέσεως, δοκιμαστικοί σωλήνες

12. Θερμόμετρο

4) ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1. Καθαρίζουμε το ακτινίδιο και το κόβουμε σε μικρά κυβάκια.
2. Βάζουμε τα κομμάτια σε ένα μπολ και πολτοποιούμε πχ με τον πάτο ενός ποτηριού ζέσεως
3. Δημιουργούμε το διάλυμα εκχύλισης: Σε 100 mL νερο προσθέτουμε περίπου 2 κουταλάκια υγρό πιάτων και 1 κουταλάκι αλάτι. Ανακατεύουμε προσεκτικά ώστε να μη δημιουργηθούν φυσαλίδες.
4. Προσθέτουμε το διάλυμα εκχύλισης στο πολτοποιημένο ακτινίδιο και συνεχίζουμε την πολτοποίηση για μερικά λεπτά.



5. Ετοιμάζουμε ένα μεγάλο μπολ και προσθέτουμε νερό σε θερμοκρασία 60° C, αναμιγνύοντας καυτό και κρύο νερό μέχρι να πετύχουμε τη σωστή θερμοκρασία. Αφήνουμε για 15 λεπτά.
6. Βγάζουμε το μπολ με το πολτοποιημένο ακτινίδιο και διηθούμε. Κρατάμε το διήθημα και το βάζουμε σε δοκιμαστικό σωλήνα.

7. Προσθέτουμε την παγωμένη αιθανόλη αργά, ώστε να σχηματιστούν δύο φάσεις (στιβάδες). Στο όριο των δύο στιβάδων θα σχηματιστεί λευκή μάζα που είναι το DNA. «Ψαρεύουμε» με τη βοήθεια μιας οδοντογλυφίδας το DNA.



5) ΦΥΛΛΟ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Τμήμα:..... Ημερομηνία:.....

Όνοματεπώνυμο μαθητών ομάδας: 1).....

2)..... 3).....

4)..... 5).....

Α. Για ποιο λόγο αρχικά πολτοποιούμε και στη συνέχεια φιλτράρουμε το μίγμα;

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

Β. Στο ακτινίδιο βρίσκονται και ένζυμα που διασπούν πρωτεϊνικά μόρια. Τα ένζυμα αυτά είναι απαραίτητα για να έχουμε αποτέλεσμα στο πείραμά μας. Με βάση τις γνώσεις σας για τη δομή του γενετικού υλικού στα ευκαρυωτικά κύτταρα, γιατί νομίζετε ότι είναι απαραίτητη η παρουσία ενζύμων που διασπούν πρωτεΐνες;

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

Γ. Μαζί με το DNA που απομονώσατε απομονώθηκε και RNA. Γιατί νομίζετε ότι έγινε αυτό; Πιστεύετε ότι το RNA σε σχέση με το DNA θα είναι λιγότερο ή περισσότερο;

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

6) ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

- Το παραπάνω πείραμα μπορεί να γίνει είτε μετωπικά είτε ως πείραμα επίδειξης. Πραγματοποιείται σχετικά εύκολα και τα υλικά που χρησιμοποιούμε είναι καθημερινής χρήσης και ασφαλή.
- Επισημαίνουμε στη συνέχεια μερικά σημεία για καλύτερα αποτελέσματα:
- Χρειάζεται καλή πολτοποίηση, κυρίως μετά την προσθήκη του διαλύματος εκχύλισης. Όσο περισσότερη ώρα πολτοποιούμε, τόσο πιο πολύ DNA απομονώνεται.
- Προσοχή! Στη φάση όπου επιδρούμε με ζεστό νερό, να προσέχουμε να μην ανέβει περισσότερο η θερμοκρασία γιατί μπορεί να καταστρέψει και το DNA.
- Η εμφάνιση του DNA δεν γίνεται άμεσα. Χρειάζεται να περιμένουμε λίγα λεπτά για να «μαζευτεί» περισσότερο DNA στη στιβάδα της αιθανόλης.

7) ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΑ ΚΑΝΟΥΜΕ

Η απομόνωση DNA μπορεί θεωρητικά να γίνει από οποιοδήποτε φυτικό ή ζωικό οργανισμό. Πολύ καλά αποτελέσματα έχουμε χρησιμοποιώντας μπανάνα ή φράουλα. Στην περίπτωση αυτή η πειραματική διαδικασία τροποποιείται ως εξής:

- Στην πολτοποίηση μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε πλαστική σακούλα φαγητών (καλύτερα να κλείνει) και να πολτοποιήσουμε με το χέρι. Προσέχουμε να μην εγκλωβίζουμε αέρα στην πλαστική σακούλα γιατί μπορεί να έχουμε ατύχημα.
- Θα χρειαστεί να προσθέσουμε να προσθέσουμε με κάποιον τρόπο ένα πρωτεολυτικό ένζυμο: πεψίνη αν υπάρχει στο εργαστήριο, χυμό ανανά ή υγρό καθαρισμού φακών επαφής.

8) ΠΕΡΙΣΣΟΤΕΡΑ ΜΠΟΡΟΥΜΕ ΝΑ ΒΡΟΥΜΕ

- Στην παρακάτω διεύθυνση το Ίδρυμα Ευγενίδου στα πλαίσια της Διαδραστικής Έκθεσης Επιστήμης και Τεχνολογίας παρουσιάζει ένα βίντεο youtube με τη διαδικασία απομόνωσης DNA:

http://www.youtube.com/watch?v=uy_GusMWT20