

Εργαστηριακή Άσκηση 1

Απομόνωση νουκλεϊκών οξέων (DNA και RNA από φυτικά κύτταρα)

Στόχος του πειράματος

Το πείραμα αυτό στοχεύει να σε εξοικειώσει με τα νουκλεϊκά οξέα. Έχοντας διαβάσει για το DNA και το RNA, τα οποία περιέχονται σε κάθε είδους κύτταρα, καλείσαι να πειραματιστείς στην απομόνωσή τους. Θα χρησιμοποιήσεις φυτικά κύτταρα από κρεμμύδι. Αρκετά από τα υλικά που θα μεταχειριστείς είναι σχεδόν καθημερινής χρήσης. Όσο και αν έχουν μυθοποιηθεί στις μέρες μας τα μακρομόρια αυτά και οι πληροφορίες που φέρουν, στο τέλος του πειράματος θα έχεις, ελπίζουμε, την ευχαρίστηση να τα «κρατάς στα χέρια σου».

Σύντομο θεωρητικό υπόβαθρο

Όπως θα θυμάσαι, στα πρώτα κεφάλαια του βιβλίου είχαμε παρομοιάσει το DNA ενός οργανισμού με ένα μοριακό «σκληρό δίσκο», που περιέχει αποθηκευμένες ακριβείς οδηγίες, οι οποίες καθορίζουν τη δομή και τη λειτουργία του οργανισμού, και οι οποίες αποτελούν τα κληρονομικά χαρακτηριστικά του. Επίσης, είχαμε αναλύσει το λεγόμενο κεντρικό δόγμα της Μοριακής Βιολογίας, τη μεταφορά δηλαδή της πληροφορίας που περιέχει το DNA στο RNA με τη διαδικασία της *μεταγραφής*. Το RNA μεταφέρει με τη σειρά του, μέσω της διαδικασίας της *μετάφρασης*, την πληροφορία στο σύστημα σύνθεσης των πρωτεϊνών, που είναι υπεύθυνες για τη δομή και τη λειτουργία των κυττάρων και, κατ' επέκταση, και των οργανισμών. Η πληροφορία για την οποία γίνεται λόγος υπάρχει σε συγκεκριμένες αλληλουχίες του DNA, στα γονίδια, τα οποία καθορίζουν, τελικά, τη σειρά των αμινοξέων στην πρωτεΐνη. Υπενθυμίζουμε ακόμη ότι τα γονίδια διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, και συγκεκριμένα στα γονίδια που μεταγράφονται σε αγγελιαφόρο RNA και μεταφράζονται στη συνέχεια, για να δώσουν πρωτεΐνες, και στα γονίδια που μεταγράφονται και παράγουν μεταφορικό RNA, ριβοσωμικό RNA και μικρό πυρηνικό RNA.

Χρονική διάρκεια

Το πείραμα αυτό διαρκεί 35 περίπου λεπτά.

Προπαρασκευή

Η αιθανόλη που θα χρησιμοποιήσουμε πρέπει να είναι παγωμένη. Γι' αυτό τοποθετήστε την στην κατάψυξη σε ένα καλά κλεισμένο πλαστικό δοχείο τουλάχιστον 24 ώρες πριν από τη διεξαγωγή του πειράματος.

Υλικά και όργανα

- Μπλέντερ κουζίνας
- κοφτερό μαχαίρι λαχανικών
- μεγάλο πλαστικό χωνί
- τριμμένος πάγος
- δύο ποτήρια ζέσεως χωρητικότητας 250 ml
- φίλτρο καφετιέρας
- ένα κρεμμύδι μεσαίου μεγέθους
- 10 ml υγρό πιάτων (όχι συμπυκνωμένο)
- 3 γραμμάρια μαγειρικό αλάτι ή NaCl
- 100 ml απεσταγμένο H₂O
- πιπέτα ή μία σύριγγα των 10 ml για την ογκομέτρηση των υγρών
- ένας γυάλινος δοκιμαστικός σωλήνας
- γυάλινη ράβδος ανάδευσης
- 2-3 σταγόνες διαλύματος 0.1 g /100 ml του ενζύμου πρωτεϊνάση ή πεψίνη (1 g / 100 ml)
- 6 ml παγωμένη αιθανόλη

Τρόπος διεξαγωγής

• Προσθέστε το αλάτι στο υγρό πιάτων, συμπληρώστε με απεσταγμένο νερό μέχρι τα 100 cm³ και ανακατέψτε καλά, ώστε να διαλυθεί όλη η ποσότητα του αλατιού.

• Κόψτε το κρεμμύδι σε μικρούς κύβους (περίπου 5 x 5mm) και προσθέστε τα κομμάτια του κρεμμυδιού στο διάλυμα του υγρού πιάτων.

• Τοποθετήστε το δοχείο στο υδατόλουτρο, που έχει ρυθμιστεί στους 60° C, για 15 ακριβώς λεπτά (εικ. 3). Στην υψηλή αυτή θερμοκρασία επιταχύνεται η διαδικασία της λύσης (σπασίματος) των κυττάρων, ενώ παράλληλα αδρανοποιούνται και πολλές από τις νουκλεάσεις των ίδιων των κυττάρων.

• Ψύξτε στη συνέχεια το δοχείο, τοποθετώντας το στον τριμμένο πάγο για 5 λεπτά και αναδεύοντας το διάλυμα κάθε μισό λεπτό.

• Ρίξτε το διάλυμα στο μπλέντερ κουζίνας και ομογενοποιήστε το για ακριβώς 5 δευτε-

1

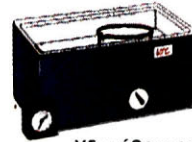


2



Ποτήρι ζέσεως

3



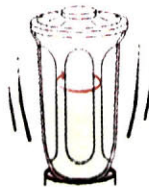
Υδατόθλυτρο

4



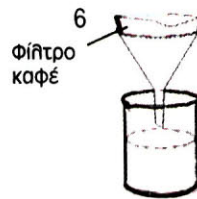
Πάγος

5



Μηχέντερ κουζίνας

6

Φίλτρο
καφέ

7



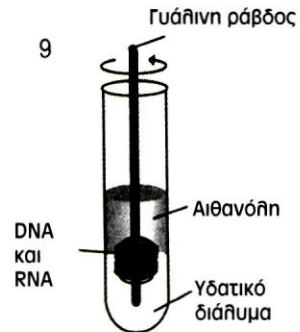
Πρωτεΐνωση

Κτυπήστε το σωλήνα
για ανάδευση

8

Παγωμένη
αιθανόλη

9



Γυάλινη ράβδος

DNA
και
RNA

Αιθανόλη

Υδατικό
διάλυμα

ρόλεπτα (εικ. 5). Είναι σημαντικό να τηρήσετε το χρόνο ομογενοποίησης, γιατί διαφορετικά σε μεγαλύτερο χρόνο το μακρομοριακό DNA καταπονείται μηχανικά και σπάει σε μικρά κομμάτια.

- Φιλτράρετε το ομογενοποιημένο υγρό περνώντας το από το χωνί με το φίλτρο και συλλέξτε το διαυγές διάλυμα σε ένα καθαρό δοχείο (εικ. 6).

- Με μια πιπέτα ή με μία πλαστική σύριγγα αναρροφήστε 10 ml υγρού και μεταφέρετέ το στο γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα.

- Προσθέστε 2-3 σταγόνες διαλύματος πρωτεΐνωσης ή πεψίνης και αναδεύστε ήπια (εικ. 7).

- Προσθέστε την παγωμένη αιθανόλη αργά και προσεκτικά, έτσι ώστε να σχηματίσει ένα στρώμα πάνω από το διάλυμα με το εκχύλισμα του κρεμμυδιού (εικ. 8).

- Ας μείνει «ανενόχλητος» ο δοκιμαστικός σωλήνας για μερικά λεπτά. Τα νουκλεϊκά οξέα

θα αρχίσουν να συσσωρεύονται στη φάση της αιθανόλης.

- «Ψαρέψτε» τα νουκλεϊκά οξέα στριφογυρίζοντας ήπια τη γυάλινη εργαστηριακή ράβδο (εικ. 9).

- Σηκώστε τη ράβδο σε γωνία 45° με το νήμα των νουκλεϊκών οξέων προς τα επάνω, και αφήστε την αιθανόλη να στραγγίξει και στη συνέχεια να εξατμιστεί.



ΑΣΚΗΣΗ 1η

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ:

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ:

α. Σε τι νομίζετε ότι συνεισφέρει το υγρό πιάτων (σαπούνι) στη διαδικασία απελευθέρωσης των νουκλεϊκών οξέων στο διάλυμα;

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

β. Για ποιο λόγο, κατά τη γνώμη σας, φιλτράρουμε το διάλυμα των σπασμένων κυττάρων; Τι νομίζετε ότι κατακρατείται στο φίλτρο και τι περνάει στο διήθημα;

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

γ. Ποιος μπορεί να είναι ο ρόλος της πρωτεΐνης;

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

δ. Γιατί πρέπει να αδρανποιηθούν οι νουκλεάσεις των κυττάρων στη διαδικασία απομόνωσης του DNA;

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



ε. Γιατί το DNA είναι ορατό μετά την προσθήκη της αιθανόλης;

.....

.....

.....

.....

.....