

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ Ν.
ΜΑΓΝΗΣΙΑΣ (Ε.Κ.Φ.Ε)
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**Θέμα: ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ (DNA ΚΑΙ RNA
ΑΠΟ ΦΥΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ)**

Μέσος χρόνος πειράματος: 45 λεπτά

A. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ



| Ø Εργαλεία | Ø Υλικά | Ø Διαλύματα - Χρωστικές |
|------------|---|--|
| § Γουδί | § 1 μπανάνα § Μαχαίρι § Κουταλάκι του γλυκού § 1 ποτήρι ζέσεως 500 ml § 3 γυάλινα ποτήρια, (δύο των 80ml και ένα των 40ml) § 1 χάρτινο φίλτρο καφέ § Πλαστική πιπέτα ή σύριγγα των 10 ml § Γυάλινος δοκιμαστικός σωλήνας § Γυάλινη ράβδος ανάδευσης | § 2-3 σταγόνες διαλύματος 0,1 g/100 ml πρωτεΐνάσης ή 1g/100 ml πεψίνης § 6 ml παγωμένη αιθανόλη § 10 ml υγρό πιάτων(όχι πολύ συμπυκνωμένο) § 250 ml απιονισμένο νερό § 3 gr μαγειρικό αλάτι |

B. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Την προηγούμενη ημέρα από την πραγματοποίηση του πειράματος βάζουμε 6 ml αιθανόλη (ή καθαρό οινόπνευμα του εμπορίου 95⁰) σε ένα γυάλινο ποτήρι των 40 ml, το σκεπάζουμε και το τοποθετούμε στην κατάψυξη του ψυγείου. Εάν δεν υπάρχει ψυγείο μπορούμε να βάλουμε λίγη αιθανόλη σε ένα πλαστικό μπουκάλι και να το τοποθετήσουμε σε ένα μεγάλο ποτήρι ζέσης που το έχουμε γεμίσει με πάγο.

Γ. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

1. Κόβουμε και ξεφλουδίζουμε την μισή μπανάνα.



2. Πολτοποιούμε όσο καλύτερα μπορούμε την μπανάνα στο γουδί.



3. Στο ποτήρι των 40 ml προσθέτουμε 1 κουταλιά του γλυκού υγρό πιάτων.



4. Προσθέτουμε λίγο μαγειρικό αλάτι στο υγρό πιάτων.



5. Στο μίγμα προσθέτουμε 4 κουταλιές του γλυκού απιονισμένο νερό.



6. Ανακατεύουμε το μίγμα με την ράβδο ανάδευσης, προσεκτικά ώστε να μην δημιουργηθεί αφρός.



7. Στο ποτήρι ζέσεως των 500 ml ρίχνουμε 250 ml απιονισμένο νερό και προσθέτουμε την πολτοποιημένη μπανάνα.



8. Ανακατεύουμε καλά το μίγμα με την ράβδο ανάδευσης ώστε να ομογενοποιηθεί.



9. Στο διάλυμα του υγρού πιάτων που έχουμε ετοιμάσει, προσθέτουμε τρεις κουταλιές του γλυκού από το μείγμα της μπανάνας.



10. Αναδεύουμε το διάλυμα με την ράβδο ανάδευσης για 5-10 λεπτά.



11. Τοποθετούμε το φίλτρο του καφέ στο δεύτερο γυάλινο ποτήρι, στερεώνοντας το άκρο του στο χείλος του ποτηριού και προσέχοντας, ώστε το φίλτρο να μην ακουμπά στον πυθμένα του ποτηριού. Ρίχνουμε το διάλυμα που έχουμε ετοιμάσει και φιλτράρουμε.



12. Μετά από λίγα λεπτά στον πυθμένα του δοχείου θα στραγγίσουν περίπου 10 mL διαλύματος μπανάνας.



13. Στο διάλυμα μπορούμε να προσθέσουμε 2-3 σταγόνες διαλύματος πρωτεΐνωσης ή πεψίνης, για να απελευθερωθούν τα νουκλεϊκά οξέα από τις πρωτεΐνες.



14. Γεμίζουμε την πλαστική πιπέτα (ή την σύριγγα) με το διάλυμα της μπανάνας.



15. Προσθέτουμε το διάλυμα σε δοκιμαστικό σωλήνα.



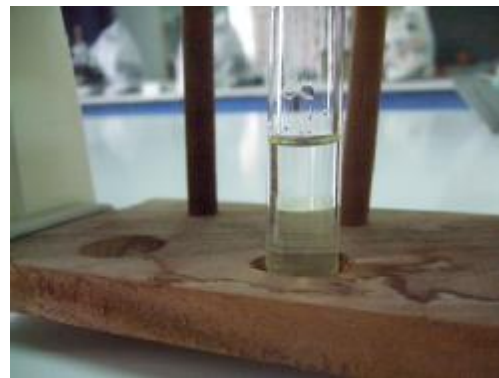
16. Γεμίζουμε μια άλλη πλαστική πιπέτα με παγωμένο οινόπνευμα.



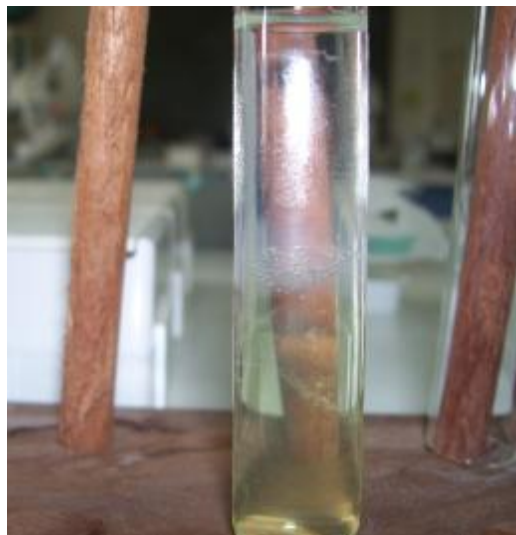
17. Προσθέτουμε προσεκτικά το οινόπνευμα στον δοκιμαστικό σωλήνα.



18. Αφήνουμε το μίγμα σε ηρεμία για 2 έως 3 λεπτά. Παρατηρούμε ότι θα δημιουργηθούν δύο φάσεις, με την φάση του οίνοπνεύματος από πάνω.
Προσοχή! Μην κουνάτε το σωλήνα.



19. Παρατηρούμε την δημιουργία φυσαλίδων μέσα στην φάση του οίνοπνεύματος.



20. Σε λίγα λεπτά μέσα στην φάση του οίνοπνεύματος αναδύεται το DNA σαν ένα νεφέλωμα.

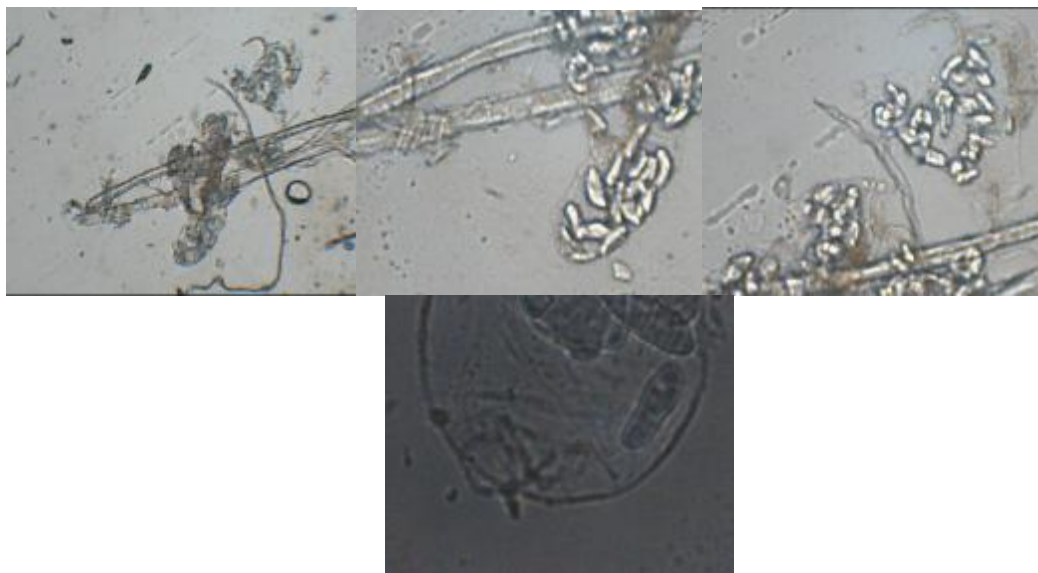


Δ. ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΣΗ (ΠΡΟΑΙΡΕΤΙΚΑ)

Μπορούμε με ένα ξυλάκι να μαζέψουμε κομμάτια των νουκλεϊκών οξέων και να τα τοποθετήσουμε σε αντικειμενοφόρο πλάκα, που έχουμε προσθέσει μια

σταγόνα αποσταγμένο νερό και να καλύψουμε με καλυπτρίδα. Στην συνέχεια να παρατηρήσουμε το δείγμα σε οπτικό μικροσκόπιο.

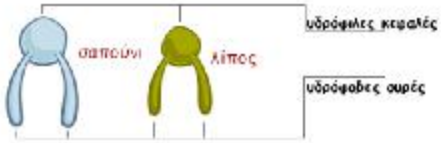
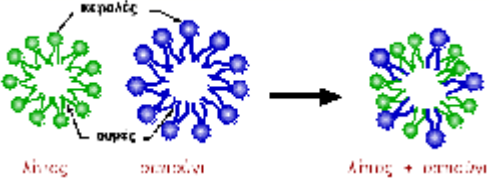
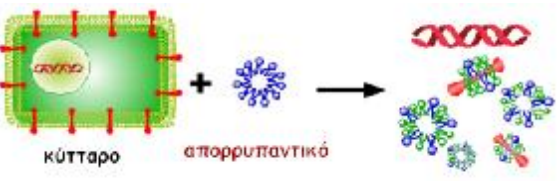

ΕΙΚΟΝΕΣ ΑΠΟ ΤΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ



Ε. ΣΥΧΝΕΣ ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ

α. Γιατί προσθέτω απορρυπαντικό;

| | |
|---|---------------------------|
| <p>Για να απομονώσουμε το γενετικό υλικό, πρέπει να σπάσουμε την κυτταρική και την πυρηνική μεμβράνη...</p> | <p>κυτταρική μεμβράνη</p> |
| <p>Αυτό το επιτυγχάνουμε με την προσθήκη του απορρυπαντικού...</p> | |
| <p>Οι μεμβράνες του κυττάρου είναι λιποπρωτεϊνικής σύστασης...</p> | |

| | |
|---|---|
| <p>Τα μόρια του λίπους και του απορρυπαντικού (σαπουνι) έχουν παρόμοια δομή καθώς αποτελούνται από υδρόφιλες κεφαλές και υδρόφοβες ουρές...</p> |  |
| <p>Έτσι, όταν ένα απορρυπαντικό αλληλεπιδράσει με λίπος, σχηματίζονται σφαιρίδια απορρυπαντικού-λίπους (λόγω της παρόμοιας δομής τους)...</p> |  |
| <p>Στο πείραμά μας, το απορρυπαντικό (σαπουνι) έρχεται σε επαφή με τις μεμβράνες του κυττάρου, συνδέεται με τα λίπη και τις πρωτεΐνες τους και τις καταστρέφει.</p> |  |
| <p>Κατά το φιλτράρισμα του διαλύματος κατακρατούνται τα λιπίδια και οι πρωτεΐνες της μεμβράνης στο φίλτρο.</p> |  |

β. Γιατί προσθέτουμε πρωτεΐνάση ή πεψίνη;

Για να απομονώσουμε το νουκλεϊκό οξύ από τις πρωτεΐνες με τις οποίες είναι συνδεδεμένο.

Η πεψίνη είναι ένα ένζυμο που εκκρίνεται σε αδρανή μορφή γνωστή ως πεψινογόνο από τους αδένες του στομάχου των σπονδυλωτών.

Το πεψινογόνο μέσα σε όξινο περιβάλλον δραστηριοποιείται σε πεψίνη όπου και διασπά τις πρωτεΐνες σε βραχείες αλυσίδες πολυπεπτιδίων, οι οποίες και στη συνέχεια διασπώνται από τις πεπτιδάσες.

γ. Που χρειάζεται η αιθανόλη και το αλάτι;

Τα νουκλεϊκά οξέα των κυττάρων βρίσκονται στο διήθημα και το αλάτι επιτρέπει να αναδυθούν παρουσία της παγωμένης αιθανόλης (οινοπνεύματος).

- Η αλκοόλη είναι λιγότερο πυκνή από το νερό και για τον λόγο αυτό επιπλέει στο νερό.
- Τα νουκλεϊκά οξέα που αναδύονται συσσωματώνονται με την βοήθεια του Na⁺ του χλωριούχου νατρίου (μαγειρικό αλάτι) που προσθέσαμε. Τα νουκλεϊκά οξέα παρουσιάζουν αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες που δημιουργούν ιοντικούς δεσμούς με τα θετικά φορτισμένα ιόντα νατρίου ευνοώντας την συσσωμάτωση των νουκλεϊκών οξέων με τη μορφή άλατος του νατρίου.
- Η αλκοόλη που προσθέσαμε δημιουργεί ένα «σύννεφο» γύρω από τα νουκλεϊκά οξέα απομακρύνοντας τα μόρια του νερού. Είναι μόριο λιγότερο

πολικό από το νερό και εξαιτίας της μικρής διηλεκτρικής της σταθεράς συμβάλλει στη δημιουργία των σταθερών ιοντικών δεσμών που αναφέρθηκαν παραπάνω.

- Η αλκοόλη προστίθεται «παγωμένη» γιατί η διαλυτότητα των αλάτων στα υγρά μειώνεται με την πτώση της θερμοκρασίας.

δ. Μπορώ να παρατηρήσω με το μικροσκόπιο τα νουκλεϊκά οξέα που απομόνωσα;

Δυστυχώς, με το μικροσκόπιο δεν μπορούμε να δούμε τη δομή της διπλής έλικας του μορίου του DNA. Το μόνο που μπορούμε να διακρίνουμε είναι μια συμπαγή μάζα από πάρα πολλά μόρια DNA. Αυτό συμβαίνει επειδή το πλάτος της διπλής έλικας του DNA είναι περίπου ένα δισεκατομμυριοστό του μέτρου, έτσι δεν είναι δυνατόν να το δούμε ακόμη και με το πιο ισχυρό μικροσκόπιο!

Υπάρχει πειραματική διαδικασία που μας επιτρέπει τη βαφή των νουκλεϊκών οξέων. Όμως, η διαδικασία είναι περίπλοκη, δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί στο σχολικό εργαστήριο και, επίσης, η χρήση των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή. Έτσι, πρέπει να εμπιστευθείς ότι τα μόρια που κατακρημνίστηκαν στην αλκοόλη είναι νουκλεϊκά οξέα.

ΣΤ. Πληροφορίες από το διαδίκτυο

- α) [http:// www.pasteur.gr](http://www.pasteur.gr)
- β) <http://www.biologyreference.com/index.html>
- γ) http://biotech.biology.arizona.edu/labs/DNA_extraction_onion_studt.html