

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

**Θέμα: ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ
ΑΠΟ ΖΩΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ)**

Μέσος χρόνος πειράματος: 45 λεπτά

A. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ



Ø Υλικά	Ø Διαλύματα - Χρωστικές
§ 1 μπουκάλι εμφιαλωμένο νερό	§ Διάλυμα πεψίνης 1g/100 ml νερού
§ Κουταλάκι του γλυκού	§ 6 ml παγωμένη ισοπροπανόλη
§ 4 γυάλινα ποτήρια (ένα των 40ml και τρία των 80ml)	§ 10 ml υγρό πιάτων(όχι πολύ συμπυκνωμένο)
§ 1 χάρτινο φίλτρο καφέ	§ 50 ml αποιονισμένο νερό
§ Πλαστική πιπέτα ή σύριγγα των 10 ml	§ 3 gr μαγειρικό αλάτι
§ Γυάλινος δοκιμαστικός σωλήνας	
§ Γυάλινη ράβδος ανάδευσης	

B. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Την προηγούμενη ημέρα από την πραγματοποίηση του πειράματος βάζουμε 6 ml ισοπροπανόλη σε ένα γυάλινο ποτήρι των 40 ml, το σκεπάζουμε και το τοποθετούμε στην κατάψυξη του ψυγείου. Εάν δεν υπάρχει ψυγείο μπορούμε να βάλουμε λίγη ισοπροπανόλη σε ένα πλαστικό μπουκάλι και να το τοποθετήσουμε σε ένα μεγάλο ποτήρι ζέσης που το έχουμε γεμίσει με πάγο. Στο πείραμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί αιθανόλη αλλά επειδή τα ζωικά κύτταρα που θα χρησιμοποιηθούν δεν είναι πολλά, καλό είναι να χρησιμοποιηθεί ισοπροπανόλη με την οποία τα νουκλεϊκά οξέα που απελευθερώνονται φαίνονται καλύτερα.

Γ. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

1. Βάζουμε στο στόμα μια γουλιά εμφιαλωμένο νερό, ξεπλένουμε καλά και το αδειάζουμε στο ποτήρι των 80ml. Μέσα στο νερό υπάρχουν αρκετά επιθηλιακά κύτταρα από την στοματική μας κοιλότητα.



2. Σε ένα άλλο ποτήρι των 80 ml προσθέτουμε 1 κουταλιά του γλυκού υγρό πιάτων.



3. Προσθέτουμε λίγο μαγειρικό αλάτι στο υγρό πιάτων.



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



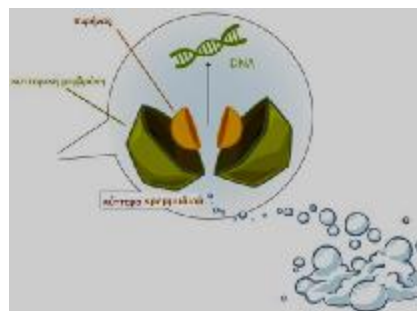
5. Ανακατεύουμε το μίγμα με την ράβδο ανάδευσης, προσεκτικά ώστε να μην δημιουργηθεί αφρός.



6. Στο διάλυμα που έχουμε ετοιμάσει αδειάζουμε το ποτήρι με το νερό και τα επιθηλιακά κύτταρα από το στόμα μας και αναδεύουμε το διάλυμα με την ράβδο ανάδευσης για λίγα λεπτά.



7. Οι μεμβράνες των κυττάρων είναι λιποπρωτεϊνικής σύστασης. Τα μόρια του λίπους και του απορρυπαντικού (σαπουνι) έχουν παρόμοια δομή καθώς αποτελούνται από υδρόφιλες κεφαλές και υδρόφοβες ουρές. Έτσι, όταν ένα απορρυπαντικό αλληλεπιδράσει με λίπος, σχηματίζονται σφαιρίδια απορρυπαντικού-λίπους (λόγω της παρόμοιας δομής τους). 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 οπότε απελευθερώνονται τα νουκλεϊκά οξέα.



8. Τοποθετούμε το φίλτρο του καφέ στο τρίτο γυάλινο ποτήρι των 80ml, 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. Κατά το φιλτράρισμα του διαλύματος κατακρατούνται τα λιπίδια και οι πρωτεΐνες των μεμβρανών στο φίλτρο.



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



9. Στο διάλυμα προσθέτουμε 2-3 σταγόνες διαλύματος πεψίνης και αναδεύουμε. Έτσι απομονώνουμε 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.

10. Προσθέτουμε μέρος του διαλύματος σε δοκιμαστικό σωλήνα.



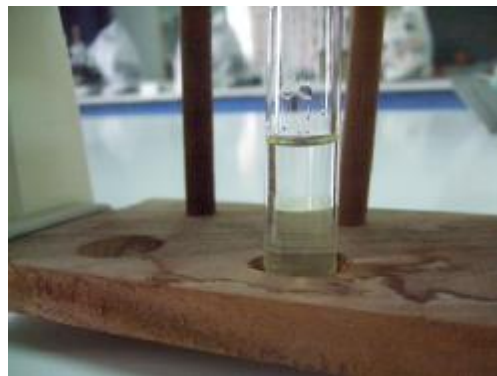
11. Γεμίζουμε την πιπέτα με την παγωμένη ισοπροπανόλη.



12. Προσθέτουμε προσεκτικά την ισοπροπανόλη στον δοκιμαστικό σωλήνα.



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



14. Παρατηρούμε την δημιουργία φυσαλίδων μέσα στην φάση της προπανόλης.

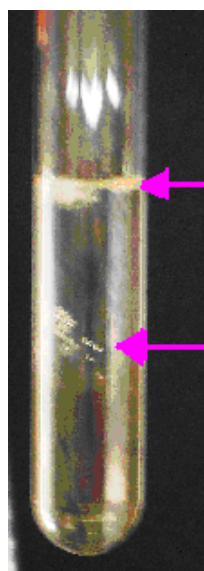


15. Σε λίγα λεπτά μέσα στην φάση της προπανόλης αναδύονται τα νουκλεϊκά οξέα σαν ένα νεφέλωμα.



- 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 νατρίου.
- 16.

- 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, ιδιαίτερα η ισοπροπυλική, 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.



Συσσωμάτωμα νουκλεϊκών οξέων στην ελεύθερη επιφάνεια.

Φυσαλίδες από νουκλεϊκά οξέα που αναδύονται στην φάση της προπανόλης.

Μπορούμε με ένα ξυλάκι να μαζέψουμε τα κομμάτια των νουκλεϊκών οξέων και να τα φυλάξουμε σε διάλυμα αλκοόλης. Δυστυχώς, με το μικροσκόπιο δεν μπορούμε να δούμε τη δομή της διπλής έλικας του. Το μόνο που μπορούμε να διακρίνουμε είναι μια συμπαγή μάζα από πάρα πολλά μόρια νουκλεϊκών οξέων. Αυτό συμβαίνει επειδή το πλάτος της διπλής έλικας του είναι περίπου ένα δισεκατομμυριοστό του μέτρου, έτσι δεν είναι δυνατόν να το δούμε ακόμη και με το πιο ισχυρό μικροσκόπιο.