

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

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

(άσκηση 10 του εργαστηριακού οδηγού)

Μέσος χρόνος πειράματος: 45 λεπτά

Τα νουκλεϊκά οξέα, όπως και οι πρωτεΐνες, είναι μακρομοριακές ενώσεις, που δομούνται από άλλες απλούστερες ενώσεις που λέγονται νουκλεοτίδια. Νουκλεϊκά οξέα είναι το δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ (DNA) και το ριβονουκλεϊκό οξύ (RNA).

Εργαστηριακή άσκηση : Απομόνωση νουκλεϊκών οξέων από φυτικά κύτταρα

Προσπαθούμε να απομονώσουμε νουκλεϊκά οξέα από φυτικά κύτταρα και συγκεκριμένα από τα κύτταρα της μπανάνας. Για τον σκοπό αυτό θα ακολουθήσουμε το πρωτόκολλο που περιγράφεται παρακάτω.

Σκοποί της άσκησης:

1. Να γνωρίσουμε τα νουκλεϊκά οξέα που περιέχονται στον πυρήνα ενός ευκαρυωτικού κυττάρου
2. Να γνωρίσουμε το πρωτόκολλο απομόνωσης των οξέων αυτών από τα κύτταρα.

Τι θα χρειαστούμε :



<u>Ø Εργαλεία</u>	<u>& Υλικά</u>	<u>Ø Διαλύματα – Χρωστικές</u>
§ Γουδί	§ 1 μπανάνα	§ 2-3 σταγόνες διαλύματος
§ Μαχαίρι	§ 1 ποτήρι ζέσεως 500 ml	0,1 g/100 ml πρωτεϊνάσης ή
§ Κουταλάκι του γλυκού	§ 3 γυάλινα ποτήρια, (δύο των 40ml και ένα των 80ml)	1g/100 ml πειψίνης
§ Χάρτινο φίλτρο	§ Πλαστική πιπέτα ή σύριγγα των 10 ml	§ 6 ml παγωμένη αιθανόλη [#]
	§ Γυάλινος δοκιμαστικός σωλήνας	§ 10 ml υγρό πιάτων(όχι πολύ συμπυκνωμένο)
	§ Γυάλινη ράβδος ανάδευσης	§ 250 ml απεσταγμένο νερό
		§ 3 gr μαγειρικό αλάτι

#Από την προηγούμενη βάζουμε 6 ml αιθανόλη (ή καθαρό οινόπνευμα του εμπορίου 95^ο) σε ένα γυάλινο ποτήρι των 40 ml, το σκεπάζουμε και το τοποθετούμε στην κατάψυξη του ψυγείου.

Πως πραγματοποιούμε την άσκηση:

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 αποσταγμένο 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 αποσταγμένο νερό και προσθέτουμε την πολτοποιημένη μπανάνα.



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



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 των 40 ml, 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 προσθέτουμε 2-3 σταγόνες διαλύματος πρωτεΐνωσης ή πεψίνης και αναδεύουμε το μίγμα.



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



15. Προσθέτουμε το διάλυμα σε δοκιμαστικό σωλήνα.



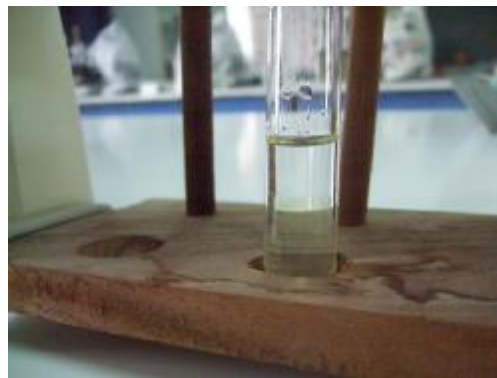
16. Γεμίζουμε μια άλλη πλαστική πιπέτα με παγωμένο οινόπνευμα.



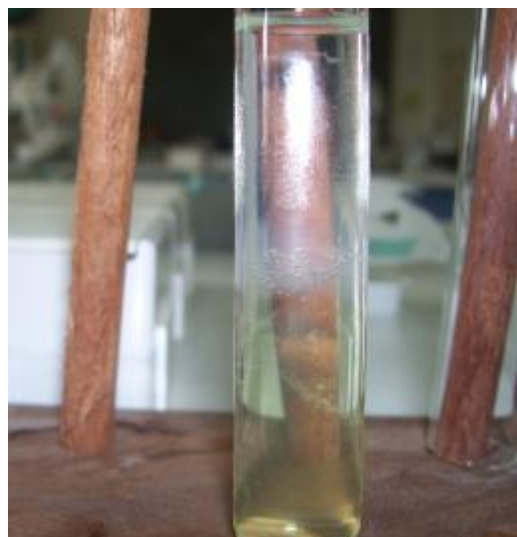
17. Προσθέτουμε προσεκτικά το οινόπνευμα στον δοκιμαστικό σωλήνα.



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 αναδύονται τα νουκλεϊκά οξέα σαν ένα νεφέλωμα.



Εξήγηση:

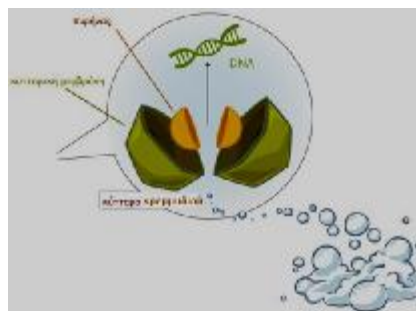
α. Γιατί προσθέτω απορρυπαντικό;

Για να απομονώσουμε το γενετικό υλικό, πρέπει να σπάσουμε την κυτταρική και την πυρηνική μεμβράνη...

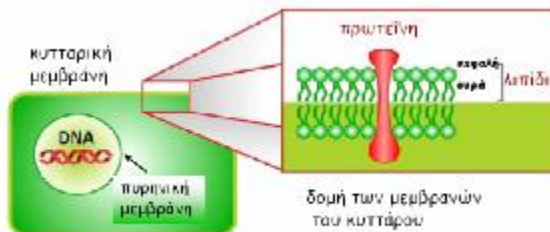
κυτταρική μεμβράνη



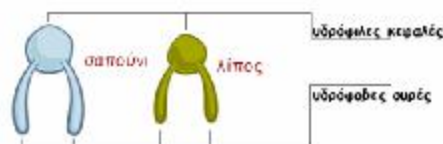
Αυτό το επιτυγχάνουμε με την προσθήκη του απορρυπαντικού...



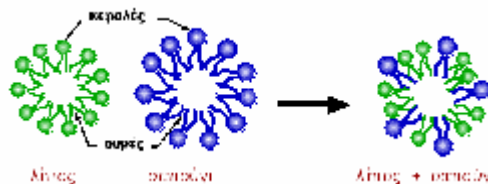
Οι μεμβράνες του κυττάρου είναι λιποπρωτεϊνικής σύστασης...



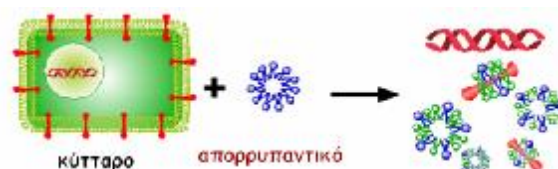
Τα μόρια του λίπους και του απορρυπαντικού (σαπουνι) έχουν παρόμοια δομή καθώς αποτελούνται από υδρόφιλες κεφαλές και υδρόφοβες ουρές...



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 ...



Κατά το φιλτράρισμα του διαλύματος κατακρατούνται τα λιπίδια και οι πρωτεΐνες της μεμβράνης στο φίλτρο.



β. Γιατί προσθέτουμε πρωτεΐνάση ή πεψίνη;

Τα ένζυμα αυτά διασπούν τις πρωτεΐνες που είναι συνδεδεμένες με το DNA.

γ. Που χρειάζεται η αιθανόλη και το αλάτι;

Η παγωμένη αιθανόλη με το αλάτι επιτρέπει τα νουκλεϊκά οξέα των κυττάρων που βρίσκονται στο διήθημα να αναδυθούν.

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

Δυστυχώς, με το μικροσκόπιο δεν μπορούμε να παρατηρήσουμε τα νουκλεϊκά οξέα που απομονώσαμε. Το μόνο που μπορούμε να διακρίνουμε είναι μια συμπαγή μάζα από πάρα πολλά μόρια τους. Αυτό συμβαίνει επειδή το πλάτος της διπλής έλικας, για το 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.

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