

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΝΕΑΣ ΦΙΛΑΔΕΛΦΕΙΑΣ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**  
**ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ ΑΠΟ ΖΩΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ**

### **Θεωρητικό υπόβαθρο**

Τα νουκλεϊκά οξέα είναι βιολογικά μακρομόρια που αποτελούνται από δομικά στοιχεία που ονομάζονται νουκλεοτίδια. Υπάρχουν δύο κύρια είδη νουκλεϊκών οξέων: το RNA (Ριβονουκλεϊκόξύ) και το DNA(δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ).

Το DNA στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς είναι γραμμικό μόριο και βρίσκεται προστατευμένο μέσα στον πυρήνα του κυττάρου. Επειδή το μήκος του είναι πολύ μεγάλο (2 μέτρα μέσα σε κάθε ανθρώπινο σωματικό κύτταρο) πακετάρεται με την βοήθεια πρωτεϊνών, σημαντικότερες από τις οποίες είναι οι ιστόνες, δίνοντας χαρακτηριστικές δομές, τα ινίδια χρωματίνης ή τα χρωμοσώματα (ανάλογα με τη φάση του κυτταρικού κύκλου στην οποία απαντούν).

Τα βασικά βήματα για την εξαγωγή DNA από νωπό υλικό (ζωντανά κύτταρα) είναι τα ακόλουθα τρία:

**1. Λύση (σπάσιμο) των κυττάρων και των πυρήνων τους.**

Για την λύση των μεμβρανών χρησιμοποιούμε απορρυπαντικό το οποίο έχει την ικανότητα να συνδέεται με τα φωσφολιπίδια των μεμβρανών και να τις αποδιατάσσει.

**2. Απελευθέρωση του DNA από τις πρωτεΐνες με τις οποίες είναι συνδεδεμένο και να συσσωμάτωση.**

Η διάσπαση των πρωτεϊνών επιτυγχάνεται με τη χρήση ειδικών πρωτεολυτικών ενζύμων όπως η πρωτεϊνάση K και η πεψίνη. Ένα είδος φυτικής πεψίνης είναι η παπαΐνη που υπάρχει στο χυμό του φρούτου παπάγια. Ακόμη και το υγρό των φακών επαφής (1-2 σταγόνες) περιέχει πρωτεάσες, που διασπούν τις πρωτεΐνες. Η συσσωμάτωση του DNA μπορεί να γίνει με τη χρήση αλατιού (NaCl). Τα θετικά μεταλλικά ιόντα του αλατιού εξουδετερώνουν τις αρνητικές φωσφορικές ομάδες του DNA, με αποτέλεσμα τα μόρια του DNA να εμφανίζουν την τάση να συσσωρεύονται μαζί.

**3. Διαχωρισμός του DNA από τα υπόλοιπα συστατικά του κυττάρου.**

Για τον διαχωρισμό του DNA από τα υπόλοιπα συστατικά του κυτταρικού εκχυλίσματος χρησιμοποιούμε αιθανόλη. Στο νερό, το DNA είναι διαλυτό. Όταν είναι σε αιθανόλη, ξετυλίγεται και καθιζάνει αφήνοντας πίσω τα άλλα κυτταρικά συστατικά, που δεν είναι διαλυτά σε αιθανόλη. Μόνο το DNA μπορεί να σχηματίσει ίνες στην αιθανόλη, καθώς το RNA σχηματίζει πολύ μικρότερα κομμάτια και οι πρωτεΐνες παραμένουν στην υδατική φάση μαζί με τα λιπίδια.

### **Πειραματικό μέρος**

<b>Υλικά</b>	<b>Σκεύη &amp; όργανα</b>
εμφιαλωμένο νερό	4 γυάλινα ποτήρια ζέσεως (ή μεγάλους δοκιμαστικούς σωλήνες ή πλαστικά ποτήρια)
απορρυπαντικό πιάτων	κουταλάκι του γλυκού
μαγειρικό αλάτι	1 χάρτινο φίλτρο καφέ
διάλυμα πεψίνης 1g/100 ml νερού	πλαστική πιπέτα ή σύριγγα των 10 ml
παγωμένη αιθανόλη	γυάλινος δοκιμαστικός σωλήνας
απιονισμένο νερό	γυάλινη ράβδος ανάδευσης

## Μέθοδος

1. Βάζετε στο στόμα σας μια γουλιά εμφιαλωμένο νερό, το κρατάτε κάνοντας «μπουκώματα» τουλάχιστον για 30 δευτερόλεπτα έως 1 λεπτό και μετά το αδειάζετε στο γυάλινο ποτήρι. Θα ήταν καλό να βοηθήσετε με τη γλώσσα, πιέζοντας σε διάφορα σημεία της στοματικής κοιλότητας, ώστε να αποκολληθούν περισσότερα κύτταρα από το επιθήλιο! Μέσα στο νερό υπάρχουν αρκετά επιθηλιακά κύτταρα από την στοματική σας κοιλότητα.
2. Σε ένα άλλο ποτήρι προσθέτετε διαδοχικά 1 κουταλιά του γλυκού απορρυπαντικό πιάτων, λίγο μαγειρικό αλάτι και 4 κουταλιές του γλυκού απιονισμένο νερό. Ανακατεύετε ήπια το μίγμα με την ράβδο ανάδευσης, για να μην δημιουργηθεί αφρός.
3. Αδειάζετε το ποτήρι με το νερό και τα επιθηλιακά κύτταρα μέσα στο διάλυμα απορρυπαντικού που έχετε ετοιμάσει και αναδεύετε προσεκτικά το διάλυμα με την ράβδο ανάδευσης για λίγα λεπτά.
4. Σε ένα τρίτο γυάλινο ποτήρι τοποθετείτε το φίλτρο του καφέ, στερεώνοντας το στο χείλος του ποτηριού με προσοχή, ώστε το φίλτρο να μην ακουμπά στον πυθμένα του ποτηριού. Ρίχνετε το διάλυμα που έχετε ετοιμάσει και φιλτράρετε. Μετά από λίγα λεπτά στον πυθμένα του δοχείου θα στραγγίσουν περίπου 10 mL διαλύματος.
5. Προσθέτετε μερικές σταγόνες διαλύματος πεψίνης στο διήθημα (2-3 περίπου) και αναδεύετε.
6. Μεταφέρετε μέρος του διαλύματος (5 ml περίπου) σε δοκιμαστικό σωλήνα.
7. Γείρετε το δοκιμαστικό σωλήνα και ενσταλάξτε αργά (σταγόνα-σταγόνα) παγωμένη αιθυλική αλκοόλη στα τοιχώματα του σωληναρίου και αφήστε να παραμείνει στην επιφάνεια του διαλύματος χωρίς ανακίνηση.
8. Αφήνετε το μίγμα σε ηρεμία για 2 έως 3 λεπτά. Παρατηρείτε ότι θα δημιουργηθούν δύο φάσεις, με τη φάση της αιθανόλης από πάνω. **Προσοχή, μην κουνάτε το σωλήνα!**
9. Στη φάση της αιθανόλης θα παρατηρήσετε αρχικά τη δημιουργία φυσαλίδων. Σε λίγα λεπτά μέσα στη φάση της αιθανόλης αναδύονται τα νουκλεϊκά οξέα, τα οποία γίνονται ορατά σαν ένα νεφέλωμα ή ακόμη και με τη μορφή λευκών ινών.
10. Χρησιμοποιώντας το πουάρ μπορείτε να αναρροφήσετε το DNA ή χρησιμοποιώντας ένα ξύλινο καλαμάκι, με κυκλικές αργές κινήσεις μπορείτε να συγκεντρώσετε το DNA από τη φάση της αλκοόλης και να το φυλάξετε σε διάλυμα αλκοόλης.

### Ηλεκτρονικές πηγές:

- [http://ekfe.mag.sch.gr/apomonosi\\_dna\\_zoika.pdf](http://ekfe.mag.sch.gr/apomonosi_dna_zoika.pdf)
- [http://ekfe.mag.sch.gr/FE\\_apomonosi\\_dna.pdf](http://ekfe.mag.sch.gr/FE_apomonosi_dna.pdf)
- <https://e-class.teilar.gr/modules/document/file.php/DIET146/%CE%91%CF%80%CE%BF%CE%BC%CF%8C%CE%BD%CF%89%CF%83%CE%B7%20%CE%93%CE%B5%CE%BD%CE%B5%CF%84%CE%B9%CE%BA%CE%BF%CF%8D%20%CE%A5%CE%BB%CE%B9%CE%BA%CE%BF%CF%8D%20%28DNA%29.pdf>
- <http://ekfe-alimou.att.sch.gr/files/gh-apomonosi-dna1-5-3-2015.pdf>