

Απομόνωση Νουκλεϊκών Οξέων Από Φράουλα

Μέλη ομάδας:

Ημερομηνία: / / 20.....

1)

2)

3)

ΔΙΔΑΚΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ

Στο τέλος της εργαστηριακής άσκησης, θα είστε σε θέση:

1. να εξάγετε και να απομονώνετε νουκλεϊκά οξέα (DNA, RNA) από φυτικά κύτταρα φράουλας.
2. να εξηγείτε τον λόγο για τον οποίο πραγματοποιείτε κάθε βήμα στην πειραματική διαδικασία.
3. να παρατηρείτε πώς φαίνονται τα νουκλεϊκά οξέα με γυμνό μάτι.
4. να διαπιστώνετε ότι τα νουκλεϊκά οξέα υπάρχουν ακόμα και σε οργανισμό που έζησε κάποτε.

ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΕΚΤΙΜΩΜΕΝΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ : 45 λεπτά**ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

Σ' αυτό το εργαστήριο, οι μαθητές θα απομονώσουν DNA από φράουλες με τη χρήση καθημερινών υλικών και θα παρατηρήσουν τη φυσική του εμφάνιση. Η εργαστηριακή άσκηση αποτελείται από τρία μέρη.

Στο **Μέρος I** οι μαθητές παρακολουθούν τη σύντομη παρουσίαση με τίτλο: "**Απομόνωση DNA**" (<http://www.edubiosite.gr/index.php/ergastirio/ergastiriakes-protaseis/79-apomonosi-dna-ppt>), όπου θα ενημερωθούν για τα βασικά σημεία που πρέπει να έχουν υπόψη τους κατά την εκτέλεση της πειραματικής διαδικασίας (*εκτιμώμενη διάρκεια: 10 λεπτά*).

Στο **Μέρος II** οι μαθητές σε ομάδες υλοποιούν την κυρίως εργαστηριακή άσκηση, ενώ παράλληλα συμπληρώνουν τις απαντήσεις των ερωτήσεων στις ενότητες **Δεδομένα και Παρατηρήσεις** και **Συμπέρασμα** του Φύλλου Καταχώρισης Αποτελεσμάτων (*εκτιμώμενη διάρκεια: 20 λεπτά*).

Στο **Μέρος III** γίνεται σύντομη συζήτηση των αποτελεσμάτων στην ολομέλεια της τάξης (*εκτιμώμενη διάρκεια: 15 λεπτά*) και παράδοση του συμπληρωμένου Φύλλου Καταχώρισης Αποτελεσμάτων στον καθηγητή.

ΥΛΙΚΑ / ΟΡΓΑΝΑ (ΑΝΑ ΟΜΑΔΑ)

Υλικά	Δύο μέτριες κρύες φράουλες, νερό (παγωμένο), μαγειρικό αλάτι, υγρό απορρυπαντικό πιάτων, υγρό φακών επαφής (τύπου RENU ή NOVASEPT SOFT, υγρό ενός βήματος χωρίς μεταλλικούς καταλύτες), αιθανόλη 93% ή 95% (παγωμένη από κατάψυξη)
Όργανα	Πλαστική σακούλα τροφίμων με φερμουάρ (slide & lock), 1 κουταλάκι του γλυκού, κουτάλι της σούπας, ογκομετρικός κύλινδρος 100 ml, ογκομετρικός κύλινδρος 10 ml, σουρωτήρι του τσαγιού, ποτήρι ζέσεως 500 ml, ποτήρι ζέσεως 250 ml, μικρός δοκιμαστικός σωλήνας, πλαστική πιπέτα Pasteur, στατό, γυάλινη ράβδος

ΠΟΡΕΙΑ ΕΚΤΕΛΕΣΗΣ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

1. Βγάλτε από το ψυγείο τη σακούλα που περιέχει τις φράουλες.
2. Με τη σακούλα κλειστή, συνθλίψτε και πολτοποιήστε τις φράουλες με τα χέρια σας για περίπου δύο λεπτά.
3. Χρησιμοποιώντας τον ογκομετρικό κύλινδρο των 100 ml, προσθέστε στη σακούλα περίπου 100 ml παγωμένου νερού, που θα βρείτε στο ψυγείο, και 1 κουταλάκι του γλυκού μαγειρικό αλάτι.
4. Κρατώντας το κλειστό επάνω μέρος της σακούλας με το ένα σας χέρι, πολτοποιήστε ξανά για περίπου ένα λεπτό.
5. Διηθείστε (σουρώστε) τον πολτό με λεπτό σουρωτήρι τσαγιού που έχετε προσαρμόσει σε ποτήρι ζέσεως 250 ml, αναδεύοντας ήπια με γυάλινη ράβδο. Φροντίστε ώστε ο πυθμένας του ποτηριού ζέσεως των 250 ml να βρίσκεται εντός άλλου ποτηριού ζέσεως 500 ml που να περιέχει πάγο και νερό.
6. Στο διήθημα προσθέτετε 1 κουταλιά της σούπας υγρό απορρυπαντικό πιάτων και αναδεύετε με τη γυάλινη ράβδο ήπια για περίπου πέντε λεπτά (προσέξτε να μην δημιουργηθεί αφρός).

Όσο περιμένετε να δράσει το υγρό απορρυπαντικό, απαντήστε στις **ερωτήσεις 1 έως 5** της ενότητας **Δεδομένα και Παρατηρήσεις** του Φύλλου Καταχώρισης Αποτελεσμάτων.

7. Διοχετεύετε 6 ml (περίπου 2 πλαστικές πιπέτες Pasteur) μίγματος σε μικρό δοκιμαστικό σωλήνα.
8. Προσθέστε 0,5 ml (περίπου 10 σταγόνες) από το υγρό καθαρισμού των φακών. Αναδεύετε ήπια με μικρές κυκλικές κινήσεις του δοκιμαστικού σωλήνα για περίπου ένα λεπτό.
9. Χρησιμοποιώντας τον ογκομετρικό κύλινδρο των 10 ml, προσθέστε στο δοκιμαστικό σωλήνα 2 ½ όγκους (περίπου 15 ml) παγωμένης αιθανόλης.
10. Κλείνοντας με τον αντίχειρά σας το άνοιγμα του δοκιμαστικού σωλήνα, ανακινείτε ήπια πάνω-κάτω το περιεχόμενο του 2 έως 3 φορές. Στη συνέχεια, αφήνετε το περιεχόμενο να ηρεμήσει. Μέσα στα επόμενα 30-60 λεπτά θα δείτε μεγαλύτερη ποσότητα συσσωματώματος νουκλεϊκών οξέων
11. Η **ινώδης και κολλώδης** ουσία στην επιφάνεια του διαλύματος αντιστοιχεί στα νουκλεϊκά οξέα. Μπορείτε να τη συλλέξετε, χρησιμοποιώντας τη γυάλινη ράβδο με περιστροφικές κινήσεις.

Αφού ολοκληρώσετε την πειραματική διαδικασία, απαντήστε στις **ερωτήσεις 6 έως 8** της ενότητας **Δεδομένα και Παρατηρήσεις** του Φύλλου Καταχώρισης Αποτελεσμάτων.

Τέλος, απαντήστε στην ερώτηση της ενότητας **Συμπεράσματα** του Φύλλου Καταχώρισης Αποτελεσμάτων.

ΧΡΗΣΙΜΕΣ ΕΠΙΣΗΜΑΝΣΕΙΣ (για τον εκπαιδευτικό)

- ❑ Στην περίπτωση που δεν υπάρχει υγρό φακών επαφής, ως αποδιατακτικό των ιστονών μπορεί να χρησιμοποιηθεί φρεσκοστυμμένος χυμός ανανά, που περιέχει το ένζυμο *bromelain*, το οποίο λειτουργεί ως πρωτεάση.
- ❑ Εάν το εργαστήριο δεν διαθέτει αιθυλική αλκοόλη, για την απομάκρυνση των νουκλεϊκών οξέων από το νερό μπορεί να χρησιμοποιηθεί ισοπροπανόλη.
- ❑ Εναλλακτικά, για τη συλλογή του συσσωματώματος νουκλεϊκών οξέων μπορεί να χρησιμοποιηθεί καλαμάκι για σουβλάκι. Και στις δύο περιπτώσεις (γυάλινη ράβδος, σουβλάκι) το συσσωμάτωμα διακρίνεται εμφανώς.
- ❑ Αν και μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν και άλλα τρόφιμα για απομόνωση νουκλεϊκών οξέων (π.χ. μπανάνα, ακτινίδιο), επιλέχθηκε η φράουλα γιατί είναι οκταπλοειδής οργανισμός (8n), δηλαδή σε κάθε της κύτταρο έχει οκτώ αντίγραφα του γενετικού της υλικού (ο άνθρωπος είναι διπλοειδής οργανισμός (2n)). Έτσι, ακόμη κι αν η διαδικασία δεν τηρηθεί με απόλυτη ακρίβεια είτε σε επίπεδο χειρισμών είτε σε επίπεδο χρόνων, η ποσότητα του γενετικού υλικού είναι τόσο μεγάλη που παρατηρείται έτσι κι αλλιώς.
- ❑ Η πειραματική διαδικασία διαφοροποιείται ελάχιστα στην περίπτωση που η απομόνωση των νουκλεϊκών οξέων γίνει από άλλο τρόφιμο, κυρίως σε επίπεδο χειρισμού του τροφίμου (π.χ. ποσότητα, διαδικασία πολτοποίησης).
- ❑ Με την παραπάνω πειραματική διαδικασία θα απομονώσετε νουκλεϊκά οξέα γενικά, και όχι μόνο πυρηνικό DNA.
- ❑ Εφόσον υπάρχει χρόνος, μπορείτε να φτιάξετε νωπό παρασκεύασμα και να παρατηρήσετε το ινώδες συσσωμάτωμα στο μικροσκόπιο. Δεν θα παρατηρήσετε τη γνωστή δεξιόστροφη διπλή έλικα του DNA ούτε άλλη δευτεροταγή δομή νουκλεϊκού οξέος (π.χ. tRNA).
- ❑ Η οριστική επιβεβαίωση ότι πρόκειται για νουκλεϊκά οξέα, μπορεί να προέλθει μόνο μέσα από την ηλεκτροφόρηση του δείγματος σε πηκτή αγαρόζης με βρωμιούχο αιθίδιο. Ωστόσο, ακόμη και τότε, το μόνο πράγμα που θα δει κανείς στην πηκτή είναι ένα επίχρισμα (smear). Το DNA που έχετε απομονώσει είναι γενωμικό, γεγονός που σημαίνει ότι έχετε συλλέξει όλο το γενετικό υλικό από κάθε κύτταρο. Γι' αυτό, και είναι δύσκολο να εγκαταλείψει ακόμη και το "πηγαδάκι" της πηκτής και να κινηθεί μέσα από τους πόρους της, εκτός και αν προηγηθεί πέψη του με περιοριστικά ένζυμα.

ΚΑΤΑΝΟΩΝΤΑΣ ΤΗΝ ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΠΙΣΩ ΑΠΟ ΤΟ ΠΕΙΡΑΜΑ

- ⊕ Χρησιμοποιούμε **κατεψυγμένες φράουλες** που έχουν αποψυχθεί και αφεθεί στη συντήρηση, προκειμένου να προκληθεί λύση των τοιχωμάτων των φυτικών κυττάρων από τους σχηματιζόμενους παγοκρυστάλλους. Επιπλέον, η χαμηλή θερμοκρασία αδρανοποιεί ένζυμα που αποικοδομούν τα νουκλεϊκά οξέα (νουκλεάσες).
- ⊕ Λύση των κυττάρων προκαλείται και από την **πολτοποίηση** της φράουλας.
- ⊕ Το **παγωμένο νερό** συμβάλλει, επίσης, στην αδρανοποίηση των νουκλεασών, και με τον τρόπο αυτό, αυξάνει την απόδοση της όλης διαδικασίας, οδηγώντας σε απομόνωση μεγαλύτερης ποσότητας DNA.
- ⊕ Τα κατιόντα νατρίου (Na^+) του **μαγειρικού αλατιού** εξουδετερώνουν το αρνητικό ηλεκτρικό φορτίο του DNA, αλλά και του RNA, που οφείλεται στα φωσφορικά ανιόντα (PO_4^{3-}). Η εξουδετέρωση αυτή, παρουσία της παγωμένης αλκοόλης, στην οποία τα νουκλεϊκά οξέα είναι αδιάλυτα, οδηγεί στο σχηματισμό ινώδους, κολλώδους συσσωματώματος, το οποίο είναι ευκρινές στα ανθρώπινα μάτια.
- ⊕ Με την **διήθηση** του πολτού απομακρύνονται τα μεγάλα κομμάτια του υλικού από το ομογενοποίημα.
- ⊕ Το **υγρό απορρυπαντικό πιάτων** σπάζει τις κυτταρικές μεμβράνες και τον πυρηνικό φάκελο, επειδή διαλύει τα λιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών και του πυρηνικού φακέλου, διαταράσσοντας

τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις που συγκρατούν τα λιπίδια και τις πρωτεΐνες στις μεμβράνες.

- ⊕ Το **υγρό φακών επαφής** χρησιμοποιείται ως αποδιατακτικό των ιστονών, προκειμένου να απελευθερωθεί το DNA από τις πρωτεΐνες.
- ⊕ Αναφορικά με την **αιθανόλη** είναι σημαντικό, αφενός να είναι παγωμένη, αφετέρου να προστεθούν 2 ½ όγκοι, ώστε να επιταχυνθεί ο σχηματισμός της μεγαλύτερης δυνατής ποσότητας του συσσωματώματος. Η προσθήκη της παγωμένης αιθανόλης απομακρύνει τα μόρια του H₂O από το DNA, έλκοντας τις υδρόφοβες αζωτούχες βάσεις του.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ελληνόγλωσση

Αλεπόρου-Μαρίνου, Β., Αργυροκαστρίτης, Α., Κομητοπούλου, Α., Πιαλόγλου, Π., Σγουρίτσα, Β. Βιολογία Θετικής Κατεύθυνσης Γ΄ Τάξης Γενικού Λυκείου. *ΟΕΔΒ*; σελ. 18,19,57,58, Αθήνα, 2009.

Απομόνωση DNA (n.d.). Ανακτήθηκε από <http://www.edubiosite.gr/index.php/ergastirio/ergastiriakes-protaseis/79-apomonosi-dna-ppt>

Καψάλης, Α., Μπουρμπουχάκης, Ι.Ε., Περάκη, Β., Σαλαμαστράκης, Σ. Βιολογία Γενικής Παιδείας Β΄ Τάξης Γενικού Λυκείου. *ΟΕΔΒ*; σελ. 36-38, 48,49, Αθήνα, 2010.

Ξενόγλωσση

How To Extract DNA From Anything Living (n.d.). Ανακτήθηκε από <http://learn.genetics.utah.edu/content/labs/extraction/howto/>

May, K. T. (2016, Ιανουάριος 03). Video: How to make a cocktail from strawberry DNA. Ανακτήθηκε από <http://ideas.ted.com/exclusive-video-how-to-make-a-cocktail-from-strawberry-dna/>

Sng8. (2012, Φεβρουάριος 29). GENIE Go Bananas! Ανακτήθηκε από <https://www2.le.ac.uk/projects/vgec/schoolsandcolleges/gobananas>

ΦΥΛΛΟ ΚΑΤΑΧΩΡΙΣΗΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ**ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ**

1. Ποιος ήταν ο σκοπός της πολτοποίησης της φράουλας;

Απάντηση

2. Για ποιο λόγο προσθέσατε μαγειρικό αλάτι;

Απάντηση

3. Γιατί διηθήσατε τον πολτό; Τι νομίζετε ότι κατακρατείται στο σουρωτήρι και τι περνάει στο διήθημα;

Απάντηση

4. Για ποιο σκοπό χρησιμοποιήσατε το υγρό απορρυπαντικό κατά την εκτέλεση του πειράματος;

Απάντηση

5. Γιατί είναι σημαντικό να πραγματοποιείται η παραπάνω πειραματική διαδικασία σε όσο το δυνατόν χαμηλότερες θερμοκρασίες; Με ποιους τρόπους επιτυγχάνεται αυτό;

Απάντηση

6. Τι εξυπηρετεί η προσθήκη του υγρού φακών επαφής στο διήθημα;

Απάντηση

7. Γιατί το DNA είναι ορατό μετά την προσθήκη της παγωμένης αιθανόλης; Εξηγήστε.

Απάντηση

8. Πώς θα μπορούσατε να αυξήσετε την ποσότητα νουκλεϊκών οξέων που απομονώσατε;.

Απάντηση**ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ**

Τελικά, υπάρχει ή όχι DNA σε νεκρούς οργανισμούς; Εξηγήστε.

Απάντηση