

## 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 m 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

### **Υλικά, σκεύη & όργανα:**

- 1 μπανάνα,
- 250 ml απιονισμένο νερό,
- μαγειρικό αλάτι,
- απορρυπαντικό πιάτων,
- διάλυμα καθαρισμού φακών επαφής,
- παγωμένη αιθανόλη,
- 2 ποτήρια,
- κουταλάκι,
- 1 χάρτινο φίλτρο καφέ,
- 1 τουλπάνι,
- πλαστική πιπέτα ή σύριγγα των 10 ml,
- γυάλινος δοκιμαστικός σωλήνας,
- ξύλινο καλαμάκι.



## Μέθοδος:

1. Βάλτε στο μπλέντερ μία μπανάνα (ξεφλουδισμένη και κομμένη σε κομμάτια), λίγο αλάτι (περίπου ¼ κουταλιά), μία κούπα κρύο νερό (παγωμένο) και πολτοποιήστε σε υψηλή ταχύτητα για 15 sec περίπου.
2. Αδειάστε το μίγμα σε ένα δοχείο, αφού το διηθήσετε προσεκτικά δύο φορές: την 1<sup>η</sup> φορά με τουλπάνι και τη 2<sup>η</sup> με το φίλτρο του καφέ.
3. Προσθέστε στο διήθημα 2 κουταλιές της σούπας αραιωμένο απορρυπαντικό πιάτων (1:1), αναμίξτε το και αφήστε το μίγμα να κατακαθίσει για 5-10 λεπτά.
4. Αδειάστε το μίγμα σε δοκιμαστικούς σωλήνες (περίπου μέχρι το 1/3 του σωλήνα).
5. Προσθέστε μερικές σταγόνες διαλύματος φακών επαφής (ή χυμού ανανά) και αναδεύστε.
6. Γείρετε το δοκιμαστικό σωλήνα και ενσταλάξτε αργά (σταγόνα-σταγόνα) παγωμένη αιθυλική αλκοόλη στα τοιχώματα του σωληναρίου (τόση ποσότητα όση και το διήθημα περίπου) και αφήστε να παραμείνει στην επιφάνεια του διαλύματος χωρίς ανακίνηση.
7. 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!**
8. 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.
9. 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.
10. Τώρα που τα καταφέρατε μπορείτε να επαναλάβετε το πείραμα και με άλλα υλικά που περιέχουν DNA, όπως φράουλες, ακτινίδια, φάβα κλπ.



*Προσπαθήστε να απαντήσετε στις παρακάτω ερωτήσεις:*

1. Σε ποιο σημείο του κυττάρου βρίσκεται το DNA και πως θα το φτάσουμε;
2. Τι ρόλο έχουν το μαγειρικό αλάτι και απορρυπαντικό στο διάλυμα εκχύλισης;
3. Γιατί φιλτράρουμε το μίγμα;
4. Γιατί χρησιμοποιούμε παγωμένη αλκοόλη;
5. Πιστεύετε ότι στην επιφάνεια επαφής διαλύματος-αιθανόλης, συγκεντρώνεται μόνο το DNA; Γιατί;
6. Μπορούμε να παρατηρήσουμε με το μικροσκόπιο τα νουκλεϊκά οξέα που απομονώσαμε;