

Isolering af DNA fra løg

Formål: At afprøve en metode til isolering af DNA fra et levende væv.
At anvende enzymer.

Indledning:

Isolering af DNA fra celler er første trin i mange molekylærbiologiske undersøgelser. Nedenstående fremgangsmåde er en meget generel metode, der kan anvendes på mange celletyper, der indeholder en vis mængde DNA.

Princippet i metoden er, at man først mekanisk nedbryder vævet, derefter nedbryder man eventuelle cellevægge, cellemembraner og kernemembraner med et vaskemiddel (et detergent). Cellefragmenter adskilles ved filtration. DNA og opløselige proteiner forbliver i det frafiltrerede væske. Med et enzym fjerner man proteinerne, og endelig udfældes DNA i iskold ethanol.

Materialer:

Til fremstilling af løg ekstrakt:

Skarp grøntsagskniv og spækbræt (hvert hold medbringer ét sæt)
Blender og stopur (fælles)
Vandbad, 60° C med termometer (fælles)
Isbad i lille plastik-balje
2 stk. 250 mL bægerglas
1 stk. kaffefilter
100 g løg (= et stort løg) evt. torskeroغن, lever el. mikroorganismer
3 g NaCl (bordsalt)
10 mL opvaskemiddel (af den billige ikke-koncentrerede slags)
100 mL destilleret vand
10 og 100 mL måleglas.

Til at adskille DNA fra løg ekstraktet:

Glasspatel eller lignende glas stav
10 mL éngangssprøjte
Stort reagensglas
Stor tragt i
Stativ med klemme, der passer til tragt
6 mL løg-vævs ekstrakt
Protease-enzym, NOVO Neutrase^R (kan skaffes fra Roskilde Slagteriskole) (fælles)
9 mL iskold 96% ethanol. Note: det er vigtigt at anvende 96% alkohol. Placer alkoholen i fryseren et døgn før forsøget. (fælles)



Fremgangsmåde: Fremstilling af løg-ekstraktet

1. Hæld 10 mL opvaskemiddel i bægerglasset. Tilsæt 3 g NaCl. Fyld på til 100 mL med destilleret vand.
2. Fjern først de døde løgskæl. Skær løget i små stykker, kantlængden ca. 5 mm. Hæld løg-stykkerne i et bægerglas, og overhæld dem med vaskemidlet/salt-opløsningen.



3. Rør i blandingen, og stil den i et 60° C varmt vandbad i præcis 15 min. Note: Denne behandling nedbryder cellemembranerne. Vaskemidlet danner komplekser med membranernes phospholipider og proteiner. Herefter vil phospholipiderne og proteinerne fælde ud af opløsningen. Na⁺-ionerne vil binde sig til DNA's negativt ladede phosphatgrupper. Ved 60° vil evt. forekommende DNAaser, der ellers kunne tænkes at nedbryde DNA, denaturere. Note: Hvis man holder temperaturen på 60° i længere tid, vil DNA nedbrydes.



4. Køl blandingen ned på et isbad i 5 min. Husk jævnligt at røre i blandingen.



5. Hæld blandingen i en blender, og kød i 5 sekunder. Ved høj hastighed. Blendning nedbryder cellevægge og membraner yderligere, hvorved DNA frigøres.

Note: hvis man blander i længere tid, ødelægges DNA-molekylerne.



6. Filtrer ned i et bægerglas gennem et kaffefilter. Undgå at få skum med ned i filtratet. Filtratet indeholder nu opløselige proteiner og DNA.

Note: Filtratet kan forberedes i én øvelsestime og opbevares i køleskab i 1-2 døgn



Adskillelse af DNA fra løg-ekstraktet

1. Hæld 6 mL løg-ekstrakt i et stort reagensglas. Tilsæt 2-3 dråber protease med en engangspipette og bland godt.

Note: Protease vil nedbryde opløselige proteiner.

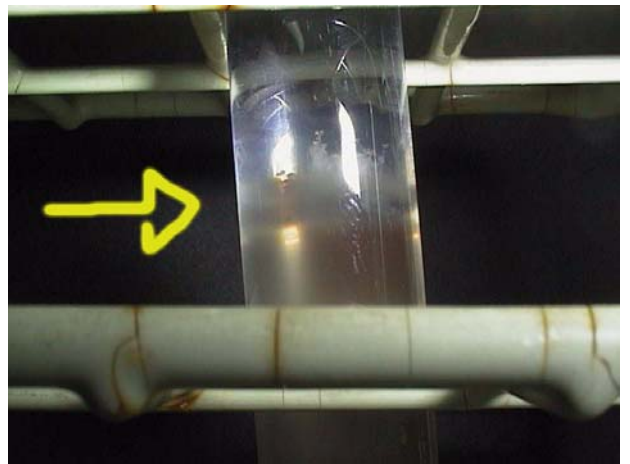


2. Tilsæt 9 mL *iskold* 96% ethanol fra en engangssprøjte til løgekstrakt/enzym-blandingen ved forsigtigt at sprøjte ethanolen ned langs reagensglassets side. Ethanol *må ikke blandes* med løgekstraktet, men skal lægge sig i et lag oven på løgekstraktet. Lad reagensglasset stå uforstyrret i 2-3 minutter. Note: DNA er uopløselig i iskold ethanol. Der vil fremkomme nogle bobler, mens de resterende proteiner opløses. DNA vil fælde ud i løgekstraktet og man vil se, hvordan DNA langsomt stiger op i alkoholen som en hvid tåge (nærmest som bomulds-vat)

3. Nu kan man se DNA udfældes som et vattet lag i alkoholen af fine DNA-tråde. Vigtig note: Nukleinsyre-opløsninger, der fremstilles på denne måde, er ikke særlig rene, man må forvente, at der specielt forekommer en del histoner i det, man til slut tror, er rent DNA. Men metoden viser de væsentligste principper ved ekstraktion af DNA fra væv.

Resultater:

Tegn en skitse af reagensglasset med det udfældede DNA. Forsyn tegningen med pile og betegnelser.



RISIKOMOMENTER:

Da der ikke arbejdes med levende organismer, er der ikke specielle sikkerhedsregler, der skal overholdes, man behøver f.eks. ikke at arbejde sterilt.

DISKUSSION:

1. Lav en skitse over en plantecelle, med angivelse af cellevæg, cellemembran, kernemembran, kromosomer (DNA og proteiner).
2. Hvorledes ødelægges plantecellernes cellulosevægge?
3. Hvilken virkning har opvaskemidlet på celle- og kernemembraner
4. Hvilken virkning har saltet som tilsættes (NaCl) på cellernes DNA-molekyler - tænk på DNA's ryggrad(vanger) fosfat-molekyler, som er negativt ladede..
5. Hvilken virkning har protease-enzymet på proteinerne i cellerne?
6. Hvad er histoner og hvordan fjernes de fra løgcellerne
7. Hvad sker der når løgblandingen opvarmes til 60° C?
8. Hvorfor afkøles løgblandingen atter, efter at den har været opvarmet til 60° C?(tænk på DNA's hydrogen-bindinger og enzymers temperaturafhængighed)
9. Hvad kunne man tænke sig at det isolerede DNA kunne benyttes til?

Kilde: Biofag særnummer, nr. 7 sept.1994. Efter Madden & Scollar,1993, "DNA your onions".
