

Εργαστηριακή Άσκηση: Απομόνωση DNA από Ζωϊκό Ιστό

Υλικά και όργανα

- Διάλυμα ομογενοποίησης 0,075M NaCl - 0,03M EDTA
- Διάλυμα 1xSSC (0,15M NaCl - 0,015M Κιτρικό Νάτριο)
- 20% SDS
- 6M NaCl
- Διάλυμα χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης 24:1
- Παγωμένη 95% αιθανόλη
- Διάλυμα 70% αιθανόλης
- Αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό
- Φυγοκεντρικά μικροσωληνάρια τύπου Eppendorf, πιπέτες, Φυγόκεντρος, Vortex, δοχεία με πάγο.

Πειραματική διαδικασία

Για να απομονώσουμε DNA θα χρησιμοποιήσουμε ως πηγή ζωϊκό ιστό στην συγκεκριμένη περίπτωση συκώτι.

- 1) Ομογενοποιούμε τον ιστό με ηλεκτρικό αναμικτήρα μέσα σε διάλυμα ομογενοποίησης (75mM NaCl - 30mM EDTA).
- 2) Φυγοκεντρούμε τον ιστό για 10 λεπτά στις 10.000 στροφές στους 4°C.
- 3) Απομακρύνουμε το υπερκείμενο.
- 4) Επαναδιαλύουμε το ίζημα προσθέτοντας 270 μl διαλύματος 1xSSC (150mM NaCl - 15 mM Κιτρικό Νάτριο).
- 5) Προσθέτουμε 30 μl διαλύματος 20% SDS. Ανατάραξη μέσα σε πάγο για 5 λεπτά.
- 6) Προσθέτουμε 150 μl υπέρκορου διαλύματος 6M NaCl. Αναταράσσουμε μέσα σε πάγο για 5 λεπτά.
- 7) Προσθέτουμε στο δείγμα μας ίσο όγκο (450 μl) διαλύματος

χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης (24/1 v/v). Το αναταράσσουμε για 5 λεπτά.

- 8) Φυγοκεντρούμε για 5 λεπτά στις 10.000 στροφές στους 4°C.

Παρατηρούμε το σχηματισμό δύο φάσεων μεταξύ των οποίων βρίσκεται μια γκρίζα ζώνη. Με μια πιπέτα απορροφάμε προσεκτικά 200μl από την ανώτερη φάση (υδάτινη) χωρίς να αναταράξουμε την διαχωριστική επιφάνεια και την μεταφέρουμε σε καθαρό μικροσωληνάριο. Το διάλυμα αυτό περιέχει το DNA και συχνά είναι ζελατινώδους υφής.

- 9) Προσθέτουμε αργά 400 μl παγωμένης 95% αιθανόλης (ή ισοπροπανόλης) και αναμιγνύουμε τις φάσεις χτυπώντας ελαφρά με το δάχτυλο το μικροσωληνάριο. Σε αυτό το στάδιο γίνεται ορατό το DNA καθώς παίρνει ινώδη μορφή.

- 10) Φυγοκεντρούμε για 15 λεπτά στις 10.000 στροφές στους 4°C ώστε να κατακρημνιστεί το DNA.

(Τα στάδια 8, 9 και 10 μπορούν να επαναληφθούν για πλήρη απομάκρυνση των πρωτεϊνών.)

- 11) Παρατηρούμε το ίζημα (pellet) του DNA στον πυθμένα του μικροσωληναρίου. Αφαιρούμε προσεκτικά το υπερκείμενο υγρό προσπαθώντας να μην πειράξουμε το ίζημα.

- 12) Προσθέτουμε 50 μl 70% αιθανόλης και ξεπλένουμε το ίζημα.

- 13) Φυγοκεντρούμε για 5 λεπτά στις 10.000 στροφές στους 4°C.

- 14) Αφαιρούμε το υπερκείμενο προσεχτικά για να μην χαθεί το ίζημα και αφήνουμε το μικροσωληνάριο ανοιχτό μέχρι να εξατμιστούν τα υπολείμματα της αιθανόλης.

- 15) Διαλύουμε το DNA σε 20 μl δισαπεσταγμένο νερό. Πριν το χρησιμοποιήσουμε τοποθετούμε το σωληνάκι σε υδατόλουτρο 60°C για 10 λεπτά.