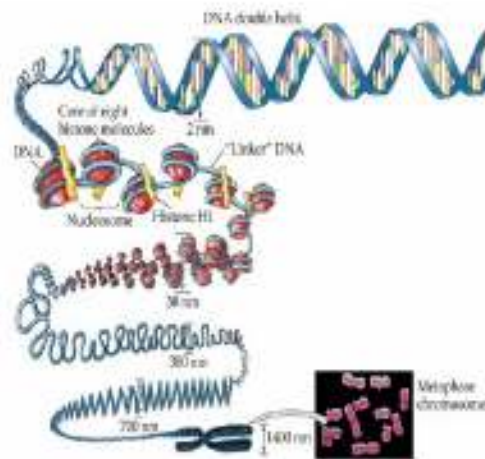


Εργαστηριακή Άσκηση: Απομόνωση DNA από ζωικό ιστό

Το DNA που εντοπίζεται στον πυρήνα κάθε κυττάρου είναι ο φορέας των γενετικών πληροφοριών και αποτελείται από εκατομμύρια νουκλεοτίδια. Η αλληλουχία των νουκλεοτιδίων δεν είναι τυχαία, αλλά ευθύνεται για τις πληροφορίες που βρίσκονται καταγεγραμμένες στα διάφορα χρωμοσώματα του πυρήνα. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα το DNA δεν είναι γυμνό, αλλά είναι δεσμευμένο σε μια ομάδα μικρών αλκαλικών πρωτεϊνών που ονομάζονται ιστόνες με αποτέλεσμα η δίκλωνη αλυσίδα του DNA να περιελίσσεται και να αναδιπλώνεται μέσα στο κύτταρο.

Η μελέτη του DNA έχει ιδιαίτερη σημασία δεδομένου ότι περιέχει τα γονίδια που ελέγχουν τη δομή και τη λειτουργία του οργανισμού. Προκειμένου να μελετήσουμε τη λειτουργία του DNA είναι καθοριστικής σημασίας η σωστή απομόνωση από τα κύτταρα.



A) Τα βασικά στάδια απομόνωσης του DNA περιλαμβάνουν:

1) Τη διάσπαση των συνδετικών ιστών και των κυττάρων από τα οποία θα απομονωθεί το DNA. Για το σκοπό αυτό ο ιστός ομογενοποιείται και τα κύτταρα εκτίθενται σε υποτονικό περιβάλλον με αποτέλεσμα τη διόγκωση του κυττάρου, τη διάρρηξη της κυτταρικής μεμβράνης και την απελευθέρωση του κυτταροπλάσματος.

Εναλλακτικά τα κύτταρα μπορεί να εκτεθούν σε ένα ήπιο απορρυπαντικό ώστε να διαλυτοποιηθούν οι κυτταρικές μεμβράνες.

2) Μετά το σπάσιμο των κυττάρων τα νουκλεϊκά οξέα πρέπει να διαχωριστούν από τις πρωτεΐνες. Αυτό μπορεί να γίνει με την προσθήκη φαινόλης και/ή την προσθήκη μείγματος χλωροφόρμιο - ισοαμυλική αλκοόλη έτσι ώστε οι πρωτεΐνες κατακρημνίζονται και μπορούν να αφαιρεθούν με φυγοκέντρηση. Επιπλέον οι πρωτεΐνες μπορούν να διαχωριστούν από τα νουκλεϊκά οξέα με την χρήση απορρυπαντικών ή με υψηλή συγκέντρωση άλατος ή με ενζυμική πέψη από πρωτεάσες.

3) Σε όλες τις περιπτώσεις τα νουκλεϊκά οξέα - ένα μείγμα από DNA & RNA μπορεί να απομονωθεί με κατακρήμιση με αιθανόλη. Από το κατακρήμισμα αυτό μπορούμε να πάρουμε το RNA με χρήση της παγκρεατικής DNA-άσης ή να απομονώσουμε καθαρό DNA χρησιμοποιώντας RNA-άση. Επιπλέον το DNA με το RNA μπορούν να διαχωριστούν με υπερφυγοκέντρηση.

B) Μέτρηση οπτικής πυκνότητας νουκλεϊκών οξέων.

Η συγκέντρωση των νουκλεϊκών οξέων υπολογίζεται με βάση την οπτική πυκνότητα του διαλύματος με τη βοήθεια του UV/Vis φασματοφωτομέτρου. Οι μετρήσεις του DNA πραγματοποιούνται σε κυψελίδες χαλαζία, το δείγμα αραιώνεται με νερό και η συγκέντρωση του DNA υπολογίζεται με βάση την απορρόφηση του στο μήκος κύματος 260nm, (A260), χρησιμοποιώντας τους παρακάτω τύπους και έχοντας υπόψη ότι 10 OD (optical density) αντιστοιχεί σε 50μg/ml για δίκλωνο ή 40μg/ml για μονόκλωνο νουκλεϊκό οξύ:

Για δίκλωνο νουκλεϊκό οξύ (μg/ml): $50 \times A_{260} \times \text{βαθμό αραιώσης}$

Για μονόκλωνο νουκλεϊκό οξύ (μg/ml): $40 \times A_{260} \times \text{βαθμό αραιώσης}$

Προκειμένου να υπολογίσουμε την καθαρότητα των νουκλεϊκών οξέων πραγματοποιείται μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 260 και 280nm και υπολογίζεται ο λόγος OD260/OD280 ο οποίος θα πρέπει να είναι 1.8-2 για καθαρά νουκλεϊκά οξέα.

Γ) Πειραματικό Μέρος

Υλικά και όργανα

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

Πειραματική διαδικασία

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

- 1) Ομογενοποιούμε τον ιστό με ηλεκτρικό αναμικτήρα μέσα σε διάλυμα ομογενοποίησης (75mM NaCl - 30mM EDTA).

Με την ομογενοποίηση επιτυγχάνεται η διάσπαση του συνδετικού ιστού ώστε να απομονωθούν τα κύτταρα. Παράλληλα η έκθεση των κυττάρων σε υποτονικό περιβάλλον διευκολύνει τη διάρρηξη των κυτταρικών μεμβρανών και την απελευθέρωση του κυτταροπλάσματος. Το διάλυμα της ομογενοποίησης περιέχει EDTA, ένα χηλικό παράγοντα που δεσμεύει δισθενή ιόντα κι έτσι παρεμποδίζει τις ενζυμικές δραστηριότητες. Με αυτό τον τρόπο το DNA προστατεύεται από τη δράση νουκλεασών (ενζύμων που καταστρέφουν το DNA).

- 2) Φυγοκεντρούμε τον ιστό για 10 λεπτά στις 10.000 στροφές στους 4°C.
- 3) Απομακρύνουμε το υπερκείμενο

Το υπερκείμενο αποτελείται κυρίως από κυτταροπλασματικά συστατικά και θραύσματα μεμβρανών.

- 4) Επαναδιαλύουμε το ίζημα σε προσθέτοντας 270 μl διαλύματος 1X SSC (150mM NaCl - 15 mM Κιτρικό Νάτριο).

Το ίζημα αποτελείται κυρίως από τους πυρήνες των κυττάρων.

- 5) Προσθέτουμε 30 μl διαλύματος 20% SDS. Ανατάραξη μέσα σε πάγο για 5 λεπτά.

Το SDS είναι ανιονικό απορρυπαντικό. Η παρουσία του διαλύει τις κυτταρικές μεμβράνες, αποδιοργανώνει τα συμπλέγματα των πρωτεϊνών μεταξύ τους και με το DNA και αναστέλλει τη δράση των νουκλεασών.

- 6) Προσθέτουμε 150 μl υπέρκορου διαλύματος 6M NaCl. Αναταράσσουμε μέσα σε πάγο για 5 λεπτά.

Η υψηλή συγκέντρωση άλατος προκαλεί το αποχωρισμό των νουκλεινικών οξέων από τις πρωτεΐνες της χρωματίνης (κυρίως ιστόνες και άλλες χρωματινικές πρωτεΐνες).

- 7) Προσθέτουμε στο δείγμα μας ίσο όγκο (450 μl) διαλύματος χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης (24/1 v/v). Το αναταράσσουμε για 5 λεπτά.

Το χλωροφόρμιο είναι οργανικός διαλύτης, που παγιδεύει τα κυτταρικά συστατικά που έχουν υδρόφοβο χαρακτήρα (όπως τα μεμβρανικά λιπίδια, υδρόφοβες πολυπεπτιδικές αλυσίδες ή πολυσακχαρίτες).

- 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.

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

Στο στάδιο αυτό επιτυγχάνουμε το διαχωρισμό του DNA από τα υπόλοιπα

κυτταρικά συστατικά κυρίως πρωτεΐνες. Το χλωροφόρμιο δεν αναμιγνύεται με το νερό και γι αυτό το λόγο μετά την φυγοκέντρηση προκύπτουν δυο φάσεις, η κατώτερη είναι η οργανική φάση και η ανώτερη η υδατινή. Η οργανική φάση παγιδεύει τα υδρόφοβα κυτταρικά συστατικά. Στην υδατική φάση παραμένουν μόρια με υδρόφιλο χαρακτήρα δηλαδή τα νουκλεϊκά οξέα, σάκχαρα, άλατα κλπ. Επιπλέον το χλωροφόρμιο αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες. Τα υδρόφοβα τμήματα των πρωτεϊνών αλληλεπιδρούν με τους οργανικούς διαλύτες ενώ τα υδρόφιλα με το υδατικό περιβάλλον. Ως αποτέλεσμα έχουμε το σχηματισμό μιας ενδιάμεσης επιφάνειας μεταξύ των δύο φάσεων (μεσόφαση). Στη μεσόφαση βρίσκονται παγιδευμένες πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες κα.

- 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.

Το DNA είναι αδιάλυτο σε υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης.

- 10) Φυγοκεντρούμε για 15 λεπτά στις 10.000 στροφές στους 4°C ώστε να κατακρημνιστεί το DNA.
- 11) Παρατηρούμε το ίζημα (pellet) του DNA στον πυθμένα του μικροσωληναρίου. Αφαιρούμε προσεκτικά το υπερκείμενο υγρό προσπαθώντας να μην πειράξουμε το ίζημα.

Το ίζημα αποτελείται από νουκλεϊνικά οξέα και άλατα που έχουν συγκατακρημνιστεί.

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

Με αυτό το βήμα απομακρύνουμε τα άλατα που έχουν κατακρημνιστεί με το DNA. Σε 70% αιθανόλη διαλύονται τα άλατα όχι όμως και το DNA.

- 13) Φυγοκεντρούμε για 5 λεπτά στις 10.000 στροφές στους 4°C.
- 14) Αφαιρούμε το υπερκείμενο προσεκτικά 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.