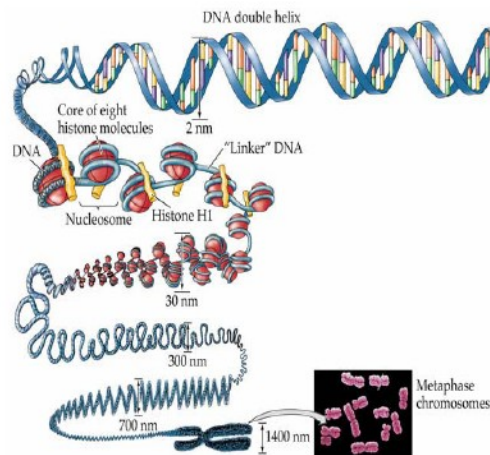


2^η Εργαστηριακή άσκηση

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.



Τα βασικά στάδια απομόνωσης του DNA περιλαμβάνουν:

- 1) Τη διάσπαση των συνδετικών ιστών, τη διάρρηξη των κυτταροπλασματικών μεμβρανών και οργανιδίων από τα οποία θα απομονωθεί το DNA. Για το σκοπό αυτό ο ιστός ομογενοποιείται είτε με μηχανικές μεθόδους είτε με χημικές μεθόδους είτε με συνδυασμό αυτών.
- 2) Ακολουθεί η απενεργοποίηση των νουκλεασών, ενζύμων που αποδομούν και καταστρέφουν το DNA.

- 3) 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.
- 4) Σε όλες τις περιπτώσεις τα νουκλεϊκά οξέα - ένα μείγμα από DNA & RNA μπορεί να απομονωθεί με κατακρήμνιση με αιθανόλη. Από το κατακρήμνισμα 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.

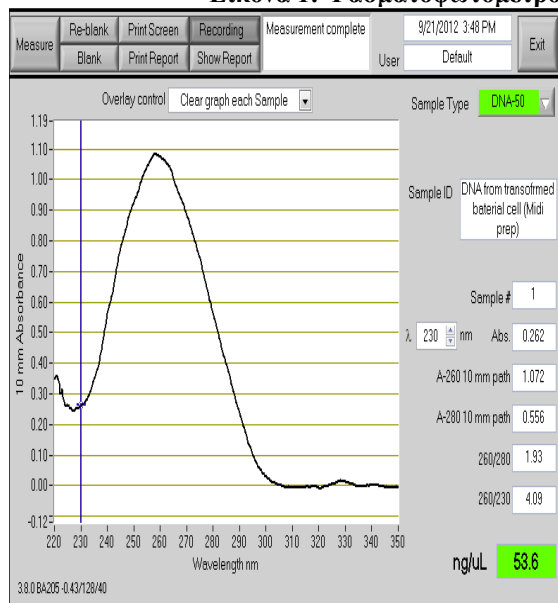
Μέτρηση οπτικής πυκνότητας νουκλεϊκών οξέων.

Η συγκέντρωση των νουκλεϊκών οξέων υπολογίζεται με βάση την οπτική πυκνότητα του διαλύματος με τη βοήθεια του UV/Vis φασματοφωτομέτρου. Τα φασματοφωτόμετρα είναι όργανα με τα οποία μπορεί να μετρηθεί η απορρόφηση μονοχρωματικής ακτινοβολίας από μία ουσία σε διάλυμα και συνεπώς η μέτρηση της συγκέντρωσης της στο διάλυμα. Η οπτική απορρόφηση (Optical Density) του DNA είναι στα 260 nm (A_{260nm}). Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του δείγματος γίνεται σύμφωνα με τον τύπο $1 \text{ O.D.}_{260nm} = 50 \text{ } \mu\text{g/ml}$. Για μονόκλωνο νουκλεϊνικό οξύ αντιστοιχεί $1 \text{ O.D.}_{280nm} = 40 \text{ } \mu\text{g/ml}$.

Προκειμένου να υπολογίσουμε την καθαρότητα των νουκλεϊκών οξέων ενός δείγματος πραγματοποιείται μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 260 και 280nm. Τα 280 nm είναι το μήκος κύματος που απορροφούν οι πρωτεΐνες. Συνεπώς υπολογίζουμε το λόγο των απορροφήσεων στα 260 nm και στα 280 nm (A_{260}/A_{280}) ο οποίος θα πρέπει να είναι 1.8 - 2 για καθαρά νουκλεϊκά οξέα. Ένα καθαρό διάλυμα DNA έχει λόγο $A_{260}/A_{280} \sim 1.8$, ενώ ένα καθαρό διάλυμα RNA έχει λόγο $A_{260}/A_{280} \sim 2$. Τιμές μικρότερες από 1.8 υποδεικνύουν προσμίξεις από πρωτεΐνες.

Ο υπολογισμός του λόγου A_{260}/A_{230} χρησιμοποιείται για να ελεγχθεί η καθαρότητα του δείγματος ως προς τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στη διαδικασία της απομόνωσης (π.χ. οργανικοί διαλύτες, EDTA, αλάτι). Ένα καθαρό διάλυμα DNA έχει λόγο $A_{260}/A_{280} \sim 2 - 2.2$.

Εικόνα 1: Φασματοφωτόμετρο Nanodrop, Thermo Scientific



Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης

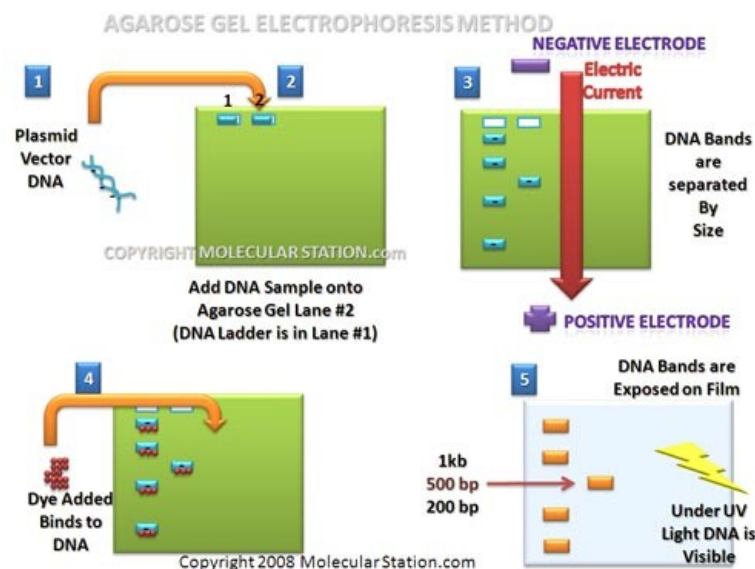
Πρόκειται για μια μέθοδο που στηρίζεται στο γεγονός ότι τα περισσότερα μακρομόρια όπως το DNA, το RNA και οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται ανάλογα με το μέγεθος τους καθώς είναι ηλεκτρικά φορτισμένα. Επομένως, όταν βρεθούν σε ηλεκτρικό πεδίο κινούνται με ταχύτητα που εξαρτάται από το λόγο του ηλεκτρικού πεδίου προς τη μάζα τους.

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε πηκτή αгарόζης ή πολυακρυλαμίδης. Η αгарόζη είναι ένας φυτικός πολυσακχαρίτης.

Η πηκτή φέρει στο εσωτερικό της πόρους των οποίων το μέγεθος εξαρτάται άμεσα από την συγκέντρωση της αгарόζης. Όσο μικρότερη η περιεκτικότητα σε αгарόζη τόσο μεγαλύτερο το μέγεθος των πόρων του σχηματιζόμενου πλέγματος.

Συγκεκριμένα, το προς ανάλυση δείγμα τοποθετείται στην πηκτή αгарόζης μέσα σε ειδικά διαμορφωμένες οπές που αποκαλούνται κελιά ή πηγάδια ή κανάλια. Η πηκτή εμβαπτίζεται σε κατάλληλο διάλυμα και στα άκρα εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση. Υπό την επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου τα αρνητικά φορτισμένα μόρια του DNA μετακινούνται προς το θετικό ηλεκτρόδιο διασχίζοντας την πορώδη πηκτή. Η ταχύτητα με την οποία κινούνται εξαρτάται από το μέγεθος τους, με τα μικρότερα τμήματα να μετακινούνται πιο γρήγορα από τα μεγαλύτερα. Στο τέλος της ηλεκτροφόρησης τα διάφορα κλάσματα του DNA έχουν διανύσει διαφορετικές αποστάσεις μέσα στην πηκτή οι οποίες είναι αντιστρόφως ανάλογες με το μέγεθός τους. Προκειμένου να γίνει ορατό το DNA, κατά την κατασκευή της πηκτής προσθέτουμε βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr), μία χρωστική η οποία συνδέεται στο δίκλωνο DNA. Όταν διεγερθεί από υπεριώδη ακτινοβολία, το DNA στο οποίο έχει προσκολληθεί το βρωμιούχο αιθίδιο και εισχωρήσει ανάμεσα σε διαδοχικά νουκλεοτίδια, έχει την ιδιότητα να φθορίζει. Επομένως, οι ζώνες στις οποίες συγκεντρώνεται το DNA γίνονται ορατές όταν η πηκτή φωτιστεί με υπεριώδη ακτινοβολία.

Κατά την ηλεκτροφόρηση μαζί με τα προς μελέτη δείγματα συμπεριλαμβάνουμε και έναν μάρτυρα. Ο μάρτυρας αποτελείται από τμήματα DNA των οποίων γνωρίζουμε το μοριακό βάρος. Σύγκριση των ζωνών των προς μελέτη δειγμάτων με το μάρτυρα επιτρέπει τον υπολογισμό του μεγέθους των κλασμάτων του DNA καθώς όλα τα δείγματα του ίδιου μεγέθους μεταναστεύουν την ίδια απόσταση από την αφετηρία.



ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A. Πρωτόκολλο Απομόνωσης DNA από Ζωϊκό Ιστό

1. Υλικά και όργανα

- Συκώτι
- Διάλυμα ομογενοποίησης (Lysis Buffer) 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 αιθανόλη 95%
- Διάλυμα αιθανόλης 70%
- Αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό
- Φυγοκεντρικά μικροσωληνάρια τύπου Eppendorf, πιπέτες, Φυγόκεντρος, Vortex, δοχεία με πάγο, στατό.

2. 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 νουκλεϊνικών 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 φυγοκέντρωση προκύπτουν δυο φάσεις, η κατώτερη είναι η οργανική

φάση και η ανώτερη η υδάτινη. 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 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. Η αιθανόλη αφαιρεί τα μόρια νερού από τον υδρόφιλο σκελετό του DNA (σταδιακή αφυδάτωση).

- 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 αιθανόλης 70% 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.

**B. Έλεγχος της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του δείγματος
DNA που απομονώθηκε, χρησιμοποιώντας φασματοφωτόμετρο
Nanodrop, Thermo Scientific**

1. Ενεργοποιήστε - ανοίξτε το φασματοφωτόμετρο, NanoDrop. Διαλέξτε το πρόγραμμα που επιθυμείτε (π.χ. Nucleic Acids).
2. Ακολουθείστε τις οδηγίες του προγράμματος. Τοποθετήστε 2 µl ddH₂O στην υποδοχή και πατήστε οκ.
3. Επιλέξτε από το μενού δεξιά το είδος της μέτρησης που επιθυμείτε (π.χ. dsDNA).
4. Σκουπίστε (με μαλακό χαρτί) τη σταγόνα του νερού (και από την υποδοχή και από το καπάκι) και τοποθετείστε 1-2 µl από το τυφλό σας δείγμα. Κλείστε απαλά το καπάκι.
5. Πατήστε BLANK.
6. Σκουπίστε τη σταγόνα του τυφλού (και από την υποδοχή και από το καπάκι).
7. Τοποθετείστε την ίδια ποσότητα από το δείγμα σας (1-2 µl) στην υποδοχή. Κλείστε απαλά το καπάκι.
8. Πατήστε MEASURE.
9. Σκουπίστε τη σταγόνα του δείγματος (και από την υποδοχή και από το καπάκι) .
10. Επαναλάβετε τα βήματα 6 έως 9 για όλα τα δείγματά σας.
11. Σκουπίστε τη σταγόνα από το τελευταίο δείγμα.
12. Τοποθετείστε 5 µl ddH₂O και κλείστε το καπάκι.
13. Σκουπίστε.
14. Κλείστε το πρόγραμμα.

C. Έλεγχος των δειγμάτων DNA με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1%

1. Ζυγίζουμε την απαραίτητη ποσότητα αγαρόζης. Η περιεκτικότητα της συγκεκριμένης πηκτής πρέπει να είναι 1%. Επομένως, για 50 ml πηκτής χρειάζεται 0,5 gr αγαρόζης.
2. Σε μία κωνική φιάλη προσθέτουμε ρυθμιστικό διάλυμα 50 ml 1 x TBE και 0,5 gr αγαρόζης.
3. Βράζουμε το εναιώρημα αγαρόζης προσεκτικά μέχρι να διαλυθεί. Το διάλυμα γίνεται διαυγές.
4. Αφήνουμε το διάλυμα να επανέλθει στους 45° C ανακατεύοντας.
5. Προσθέτουμε 2ml βρωμιούχο αιθίδιο και ανακατεύουμε ελαφρά.

ΠΡΟΣΟΧΗ: Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι ισχυρό μεταλλαξιγόνο και χρειάζεται μεγάλη προσοχή τόσο κατά την παρασκευή του όσο και κατά τη χρησιμοποίησή του.

Πάντα φοράμε γάντια και μετά το πείραμα πλένουμε καλά όλα τα σκεύη με νερό.

6. Ετοιμάζουμε το πιάτο της συσκευής. Τοποθετούμε τις χτένες και προσέχουμε να μην ακουμπούν στην κάτω επιφάνεια του πιάτου.
7. Αδειάζουμε το διάλυμα της αγαρόζης στο πιάτο της συσκευής.
8. Περιμένουμε μέχρι να πήξει η αγαρόζη.
9. Αφαιρούμε τα χτένια και τοποθετούμε την πηκτή στη συσκευή.
10. Γεμίζουμε με διάλυμα 1 x TBE μέχρι να καλυφθεί τελείως η πηκτή.
11. Φορτώνουμε τα δείγματα στην πηκτή. Για κάθε δείγμα: βάζω 5 μl από το δείγμα DNA που απομονώθηκε, 1,5 μl 10x διάλυμα φόρτωσης (Loading Buffer) που περιέχει χρωστικές που μας βοηθούν να παρακολουθούμε την πορεία της ηλεκτροφόρησης.
12. Φορτώνω 2 μl από έναν δείκτη γνωστού μοριακού βάρους (Ladder) που δίνει ζώνες γνωστού μεγέθους για να μας βοηθήσει να υπολογίσουμε το μοριακό βάρος των νουκλεϊκών οξέων που μελετάμε.
13. Συνδέουμε τα ηλεκτρόδια στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, ρυθμίζουμε την τάση στα 90 – 100 volts.
14. Παρατηρούμε την πηκτή στη συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) και ελέγχουμε την ποιότητα του DNA.

D. Master Chef στην απομόνωση DNA
Πρωτόκολλο Απομόνωσης DNA από Φυτικό Ιστό

Διαβάστε όλες τις οδηγίες πριν ξεκινήσετε.

Υλικά:

1. πηγή DNA
2. blender
3. ελάχιστη ποσότητα αλατιού
4. ένα σουρωτήρι
5. τούλι
6. ένα διαφανές γυάλινο ποτήρι ή βαθμολογημένη κανάτα ή ένα πλαστικό μπουκάλι νερού αφού πρώτα κόψετε το στόμιο ή έναν κεσέ ή ένα βαθύ πιάτο
7. 2 κουταλιές της σούπας (30 ml) υγρό απορρυπαντικό
8. υγρό καθαρισμού φακών επαφής
9. λευκό οινόπνευμα (70 – 95%)

Εκτέλεση:

- **Βήμα 1°:** Ανακαλύψτε πηγές DNA στην κουζίνα σας.

Παράδειγμα: κρεμμύδι, μαγιά, μπρόκολο, σπανάκι

- **Βήμα 2°:** Η ομογενοποίηση στο blender.

Τοποθετήστε στο blender: a) ελάχιστο κρύο νερό
b) το δείγμα που έχετε επιλέξει

Αναμιγνύετε στο δυνατό επίπεδο για τουλάχιστον 15 δευτερόλεπτα. Το αποτέλεσμα πρέπει να είναι μια παχύρρευστη σούπα.



- **Βήμα 3°:** Αλατίστε το δείγμα σας.

Προσθέστε 1/8 κουταλάκι του γλυκού αλάτι. Λιγότερο από 1ml. Ανακατέψτε

- **Βήμα 4°:** Στραγγίξτε το δείγμα σας.

Περάστε την παχύρρευστη κυτταρόσουπά σας από ένα σουρωτήρι. Σας προτείνουμε να βάλετε ένα τούλι μέσα στο σουρωτήρι για καλύτερα αποτελέσματα.



- **Βήμα 5°:** Σαπουνίστε το δείγμα σας.

Βάλτε τη σουρωμένη σούπα σε ένα καθαρό δοχείο π.χ. ένα διαφανές γυάλινο ποτήρι, μία βαθμολογημένη κανάτα, ένα πλαστικό μπουκάλι από νερό αφού πρώτα κόψετε το στόμιο, ένα κεσέ, ένα βαθύ πιάτο.

Προσθέστε 2 κουταλιές της σούπας (30 ml) από υγρό απορρυπαντικό. Ανακατέψτε.



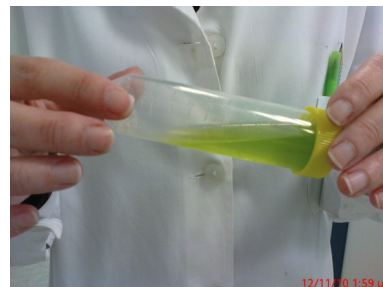
Αφήστε το μείγμα να ξεκουραστεί για 10 -15 λεπτά.

Ρίξτε λίγο από το μίγμα σε σωληνάκι, στενό, διαφανές, γυάλινο ποτήρι ή μικρό δοχείο. Το δείγμα θα πρέπει να καταλαμβάνει το πολύ το 1/3 του δοχείου.



- **Βήμα 6°: Η δύναμη του ενζύμου.**

Ως ένζυμο μπορείτε να χρησιμοποιήσετε υγρό καθαρισμού φακών επαφής. Προσθέστε μία ελάχιστη ποσότητα από το ένζυμο στο δείγμα σας και ανακατέψτε ελαφρά. **Προσοχή !!!** εάν ανακατέψετε έντονα, θα σπάσετε το DNA, και δεν θα μπορέσετε να το δείτε..



- **Βήμα 7°: Διαχωρισμός αλκοόλης.**

Γύρτε το γυάλινο δοχείο με το δείγμα σας και αργά αργά, χωρίς να ανακατευτεί το δείγμα σας, ρίξτε παγωμένη αιθυλική αλκοόλη 70 – 95 % (οινόπνευμα). **Προσοχή !!!** χρησιμοποιείτε το λευκό και όχι το μπλε οινόπνευμα. Η κατάλληλη ποσότητα είναι δύο όγκοι παραπάνω από την ποσότητα του δείγματος που τοποθετήσατε στο γυάλινο δοχείο.



Επαναφέρετε σιγά σιγά το δοχείο με το δείγμα σας στην όρθια θέση. **ΠΡΟΣΟΧΗ !!! ΔΕΝ ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΑΝΑΚΑΤΕΨΕΤΕ ΤΟ ΔΕΙΓΜΑ.**

Θα πρέπει να σχηματιστεί ένα στρώμα σα συννεφάκι στην επιφάνεια του δείγματός σας. Η αλκοόλη είναι λιγότερο πυκνή από το H₂O με αποτέλεσμα να επιπλέει στην κορυφή. Κοιτάζτε για συστάδες από ινώδες, σκληρό υλικό όπου το στρώμα H₂O και αλκοόλης συναντώνται.

Τι είναι αυτό που απομονώθηκε;

Το DNA είναι μακρύ, ινώδες μόριο. Το αλάτι το οποίο προστέθηκε στο Βήμα 3 βοηθά να παραμείνει ενωμένο. Επομένως, αυτό που παρατηρείτε είναι συστάδες / συσσωματώματα από μόρια DNA.



- **Βήμα 8^ο:** Η μεταφορά στο εργαστήριο.

Με μία οδοντογλυφίδα / μπατονέτα / γυάλινο ραβδάκι μπορείτε να το συλλέξετε.

Τοποθετήστε το σε ένα σωληνάκι (eppendorf) με οινόπνευμα.



Εργασία: Η εργασία αυτή θα περιλαμβάνει το DNA το οποίο απομονώσατε και μία αναφορά. Στην αναφορά θα περιγράφετε τι πραγματοποιήσατε - προσθέσατε σε κάθε βήμα της απομόνωσης και γιατί, τις δυσκολίες που προέκυψαν και πως τις αντιμετωπίσατε μέχρι να φθάσετε στο τελικό αποτέλεσμα καθώς και τη βιβλιογραφία που χρησιμοποιήσατε. Η έκταση της αναφοράς θα είναι 1-2 σελίδες (μία σελίδα A4 μπρος-πίσω). Θα κατατεθεί εκτυπωμένη.