

EKSPERYMENT

„Izolacja DNA z cebuli”

Abstrakt

Prosta i bardzo szybka metoda wytrącania kwasów nukleinowych (dla ułatwienia DNA) pozwalająca na zobaczenie ich gołym okiem.

Słowa kluczowe

genetyka, DNA, RNA, kwasy nukleinowe, izolacja, cebula

Materiały

- pół cebuli
- łyżeczka soli kuchennej (najlepiej niejodowanej)
- kilka mililitrów spirytusu (>95% etanol) lub izopropanolu (najlepiej zamrożonego lub przynajmniej z lodu)
- kropla płynu do mycia naczyń
- moździerz
- mały lejek
- filtr do kawy, ręcznik papierowy lub chusteczka higieniczna
- wykałaczka lub cienki drewniany patyczek
- woda
- naczynia: szklanka lub stoik, mała szklanka lub mały słoiczek, probówka lub wysoki i wąski kieliszek
- lód
- nóż
- deska do krojenia
- miseczka lub mały garnek
- łyżeczka
- szmatka lniana
- tłuczek lub młotek

Uwaga: bezpieczeństwo

Doświadczenie jest bezpieczne, ale należy unikać wdychania alkoholu, zwłaszcza izopropanolu.

Warunki szczególne

Konieczna jest zamrażarka. Doświadczenie najlepiej wychodzi, jeżeli używa się zamrożonego alkoholu. Potrzebny jest też lód.

Wykonanie

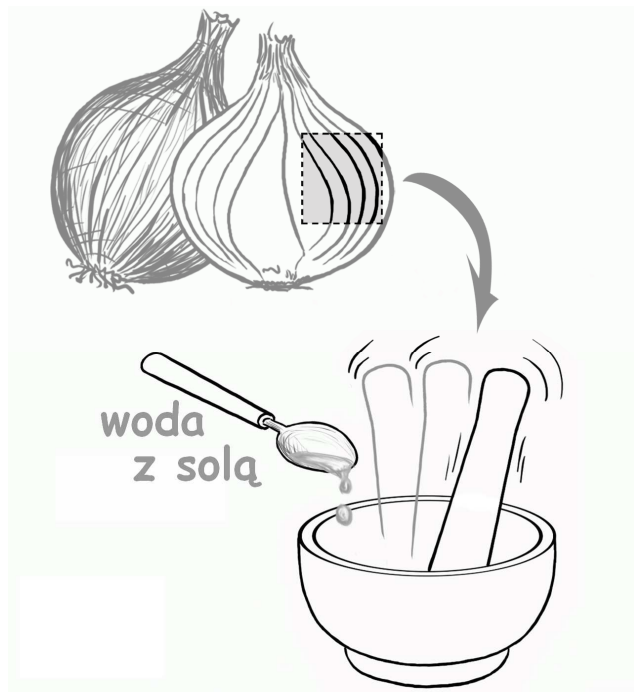
1. Przygotowanie:

Rozpuść jedną łyżeczkę soli kuchennej w ok. 100 ml wody (trochę mniej niż pół szklanki). Kilka kostek lodu zawiń w lnianą szmatkę, rozbij je młotkiem na drobne kawałki i wsyp do miseczki lub małego garnuszka.

2. Procedura:

Z połówki cebuli wykrój kawałek o objętości mniej więcej 3 cm³ – najlepiej z części wewnętrznej, ale nie z trzonu, z którego wyrastają korzenie. Poszatkuj go jak najdrobniej, włóż do moździerza, wlej dwie łyżeczki wody z solą i energicznie utrzyj na gładką masę. Uzyskaną masę przenieś do małej szklanki, dolej do niej wody z solą, aby objętość zwiększyła się dwu-, trzykrotnie, dodaj dużą kroplę płynu do mycia naczyń i delikatnie pomieszaj. Włóż szklankę do miski z lodem, tak aby lód sięgał do poziomu płynu. Mieszając co pewien czas, odczekaj 5 minut. Po chwili mieszanina zacznie być lepka, co można sprawdzić, zanurzając w niej wykałaczkę lub drewniany patyczek.

Probówkę umieść w słoiku lub na statywie i włóż do niej lejek. Wnętrze lejka wyłóż filtrem i zwilż go wodą. Mieszaninę wyjętą z lodu przelej do lejka i poczekaj, aż w probówce zbierze się przesącz (wystarczy, żeby płyn miał 4–5 cm wysokości). Usuń lejek, lekko przechyl probówkę i bardzo ostrożnie nalej po ściance trochę zmrożonego spirytusu – tyle, żeby utworzył słup o podobnej wysokości, co słup przesącza. Odstaw probówkę na 2–3 minuty. Spirytus pozostanie na górze, a na styku fazy będzie można zaobserwować wytrącanie się DNA. Możesz przechylić probówkę i delikatnie obracać ją wokół osi pionowej. DNA tworzy małe, białe kłaczkę o nitkowatej strukturze. Można je nawet nawinąć na wykałaczkę lub patyczek i wyjąć z roztworu. Po wysuszeniu DNA jest niewidoczny. Znakomicie rozpuszcza się w wodzie.



Wytłumaczenie

RNA = ribonucleic acid, kwas rybonukleinowy

DNA = deoksyribonucleic acid, kwas deoksyrybonukleinowy

W komórkach żywych organizmów znajduje się jądro komórkowe, a w nim kwasy nukleinowe, DNA i RNA. Kwasy te różnią się od siebie w sensie chemicznym jedynie obecnością jednego tlenu w cukrze (rybozie), który wchodzi w ich skład (w DNA ryboza pozbawiona jest tlenu i nosi nazwę deoksyrybozy – stąd bierze się D w skrótce DNA). Choć kwasy są podobne chemicznie, pełnią w komórce inne role.

Zastosowana w doświadczeniu metoda izolacji opiera się na cechach chemicznych tych związków, dlatego za jej pomocą izoluje się zarówno DNA, jak i RNA. Dla uproszczenia procedurę określa się jednak mianem izolacji DNA.

Kwasy nukleinowe można wyizolować dość łatwo metodą przypominającą procedury używane w laboratoriach. Oto wytłumaczenie jej etapów:

1. Rozcieranie tkanek: tkanki muszą zostać pofragmentowane na komórki, a komórki muszą popękać, żeby wydobyć z nich DNA. Intensywne oddziaływanie mechaniczne jest znakomitą metodą rozbijania tkanek na pojedyncze komórki. Jest to szczególnie ważne w przypadku komórek roślinnych, które otoczone są grubą ścianą komórkową – mechaniczne oddziaływanie narusza jej strukturę.
2. Dodatek detergentu powoduje, że rozpadają się błony komórkowe (złożone z lipidów, które mają charakter tłuszczowy), a wewnątrz komórki wydostaje się do roztworu (liza komórki, mieszanina „ciągnie się”).
3. Po uwolnieniu wewnątrz komórek DNA narażony jest na degradację (rozkład na składniki budulcowe) i fragmentację. Niska temperatura hamuje aktywność białek (enzymów) degradujących DNA, a obecność soli powoduje wytrącanie tych białek z roztworu.
4. Na filtrze zostają wszystkie niepotrzebne elementy tkanek – duża ilość DNA znajduje się w przesączu.
5. DNA jest kwasem, którego reszty naładowane są ujemnie. Dzięki temu jony Na^+ z soli kuchennej otaczają cząsteczki DNA. Przy wysokim stężeniu soli w obecności etanolu (alkoholu) DNA zmienia swoją przestrzenną strukturę i tworzy agregaty (duże, nieuporządkowane kompleksy) – wytrąca się. Dzięki temu jest widoczny jako długie nitki. Proces jest szczególnie wydajny jeżeli etanol jest bardzo zimny.

UWAGA – DŁUGIE NITKI TO NIE POJEDYNCZE CZĄSTECZKI DNA! SĄ ONE ZBYT MAŁE, ŻEBY JE ZOBACZYĆ BEZ BARDZO SILNEGO MIKROSKOPU!

DNA jest związkiem, w którego strukturze zapisana jest informacja genetyczna. Cząsteczki RNA służą do odczytywania tej informacji. W DNA zapisane są informacje o budowie wszystkich białek komórkowych (takie fragmenty DNA nazywa się genami). Geny to jednak jedynie niewielka część DNA (np. w komórkach ssaków stanowią tylko 3%). Reszta sekwencji służy do regulacji procesu odczytywania informacji, nadaje DNA strukturę, odpowiada za powielanie materiału genetycznego i przekazywanie go do komórek potomnych i pełni wiele innych funkcji. Kwasy nukleinowe regulują wszelkie procesy życiowe komórek, a co za tym idzie – całych tkanek i organizmów.

Alternatywy

Do izolacji DNA można użyć innych roślin, np. ziaren pszenicy, truskawek, kiwi. Kiwi wyjątkowo dobrze nadaje się do tego celu, ponieważ w jego soku znajduje się enzym trawiący białka, także takie, które mogą degradować DNA w trakcie izolacji.

Zamiast morderstwa można użyć blendera, czyli miksera z szybko obracającym się ostrzem. Niektórzy polecają inkubację mieszaniny w gorącej wodzie (ok. 65 °C) przed umieszczeniem jej w lodzie.

Rozwiązywanie problemów

Procedura jest prosta, jednak chcąc mieć pewność, że doświadczenie się uda, należy powtórzyć je kilka razy.

UWAGA: efekt jest subtelny. To, co mamy zobaczyć, jest delikatne i cieniutkie. Probówkę trzeba oglądać pod światło.

Na co należy zwrócić uwagę, by doświadczenie się udało? Oto kilka ważnych wskazówek:

- Nie używaj dużej ilości materiału. To zwiększa objętość próbki i powoduje, że np. proces chłodzenia zachodzi wolniej i dłużej trwa. W przypadku cebuli wystarczy 1 cm³.
- Jeśli filtr (chusteczka) się zatka, należy wymienić go na nowy. Można też delikatnie (żeby nie pękł) złapać jego brzegi i odkleić go od lejka. Pulpy na filtrze jest znacznie więcej niż potrzeba do uzyskania przesączu.
- Miksowanie tkanki lub ucieranie w moździerzu jest KLUCZOWYM etapem, ponieważ wtedy naruszona zostaje struktura ściany komórkowej. Zatem im bardziej gwałtownie będzie się to odbywać, tym lepiej, bo więcej DNA uwolni się z tkanki.
- Należy zadbać o to, żeby inkubacja w lodzie rzeczywiście schłodziła mieszaninę, dlatego lód musi sięgać do wysokości płynu w szklaneczce (dobrze działa mieszanka lodu z wodą). W trakcie inkubacji należy próbkę co pewien czas zamieszać.
- Alkohol powinien być jak najbardziej zmrożony, bo ciepły nie wytrąci DNA wydajnie. trzeba przynajmniej schłodzić go w lodzie.
- Wytrącanie DNA należy przeprowadzać delikatnie, ponieważ DNA może zostać pofragmentowany.
- Całą procedurę należy wykonywać szybko. Zbyt długie manipulacje powodują degradację DNA, przez co może nie udać się go zobaczyć.

