

# ΕΚΦΕ ΑΛΙΜΟΥ

## Απομόνωση DNA – RNA από επιθηλιακά κύτταρα της στοματικής κοιλότητας

Ηλίας Γιασεμής, Βιολόγος, MSc, PhD  
Ανδρέας Ζοάνος, Βιολόγος

# Διδακτικοί στόχοι

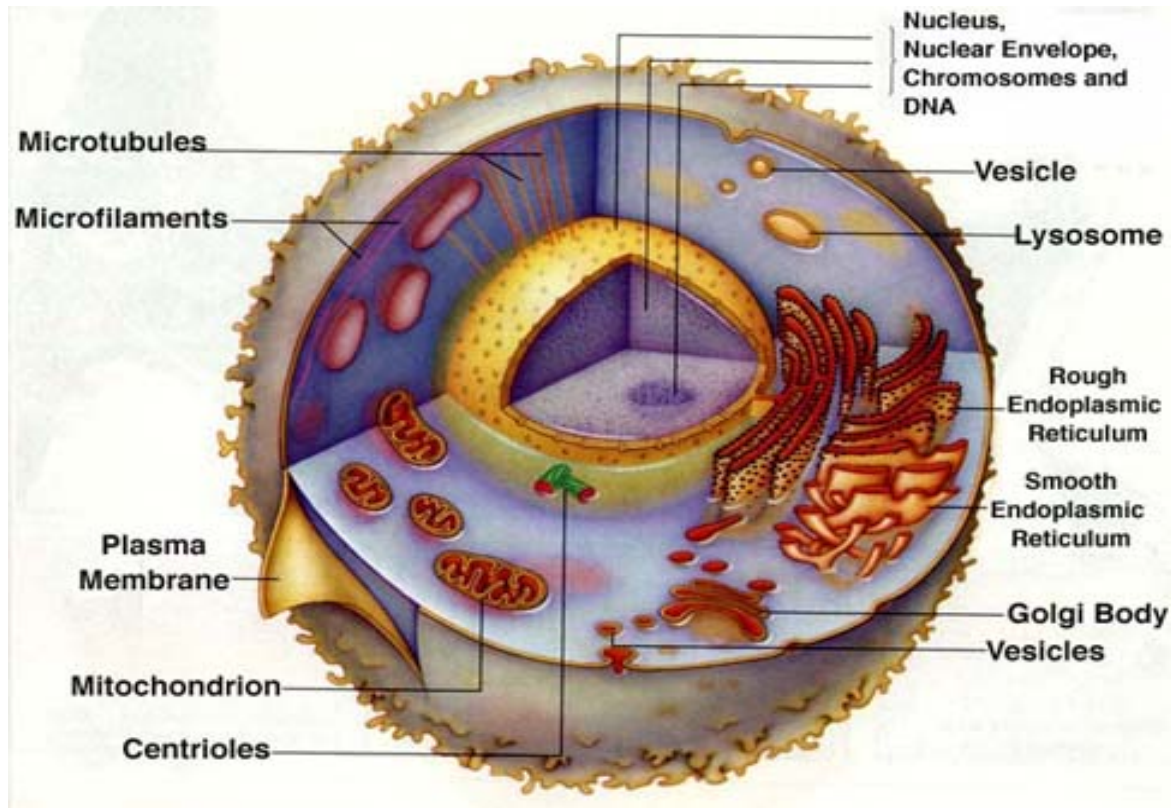
Οι μαθητές :

- Να αναγνωρίσουν ότι κύτταρα βρίσκονται παντού στο σώμα μας και περιέχουν νουκλεϊνικά οξέα.
- Να διαπιστώσουν ότι το DNA (και δευτερευόντως το RNA) σχηματίζει συσσωματώματα που μπορούν να παρατηρηθούν με γυμνό μάτι.
- Να μυηθούν με απλά μέσα στο σκεπτικό, τους περιορισμούς και τις διαδικασίες ενός πειράματος βιολογίας.
- Να εξοικειωθούν στη χρήση οργάνων και υλικών του εργαστηρίου βιολογίας.

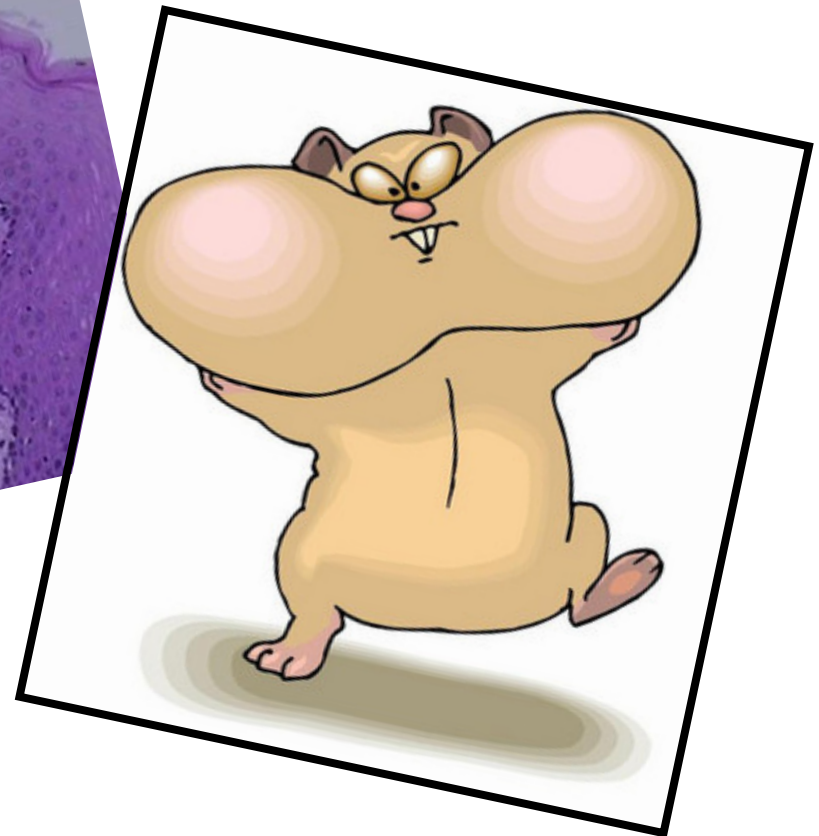
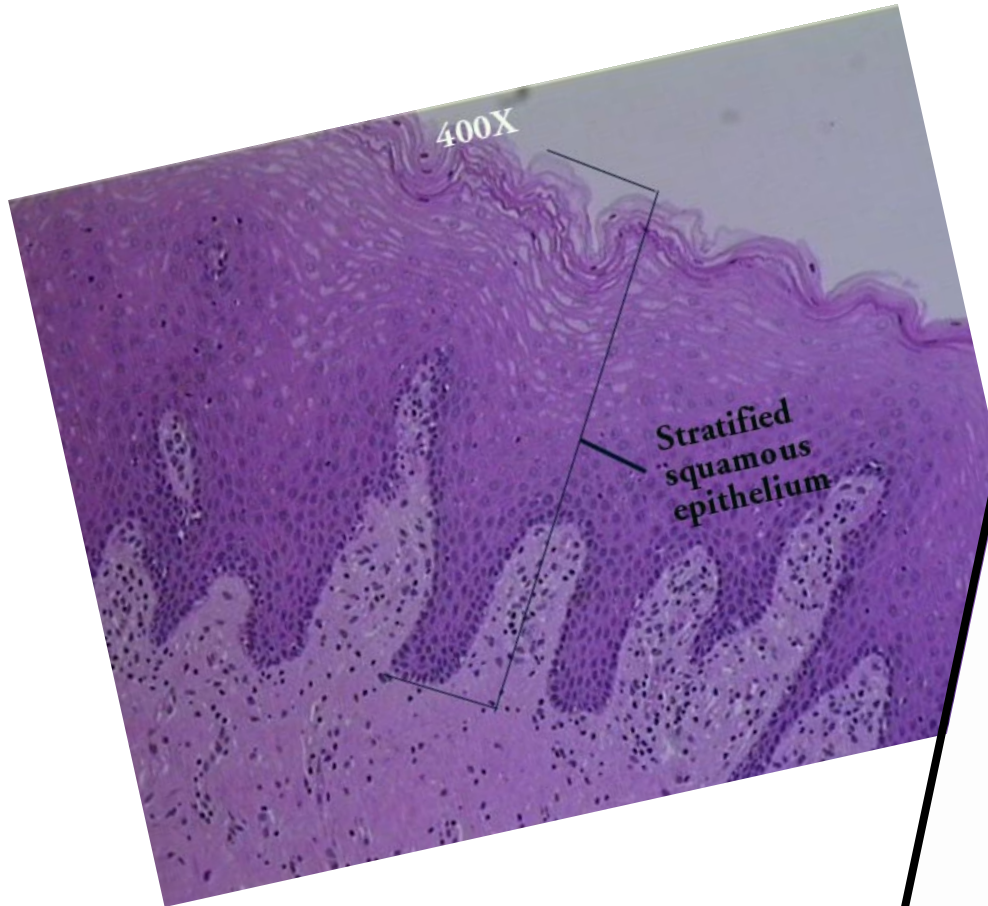
# Εισαγωγή

- ✓ Το DNA βρίσκεται στα κύτταρα όλων των ζωντανών οργανισμών. Με το παρακάτω πείραμα οι μαθητές θα δουν συσσωματώματα του δικού τους DNA (κυρίως) .
- ✓ Για την απελευθέρωση του DNA από τις μεμβράνες θα χρησιμοποιηθεί κατάλληλο διάλυμα εκχύλισης. Επίσης θα χρησιμοποιηθούν πρωτεάσες και περιβάλλον αναστολής της δράσης των νουκλεασών.
- ✓ Το DNA θα σχηματίσει συσσωμάτωμα με την προσθήκη αλκοόλης.
- ✓ Το DNA αυτό μπορεί να συλλεχθεί. Είναι το DNA του μαθητή!

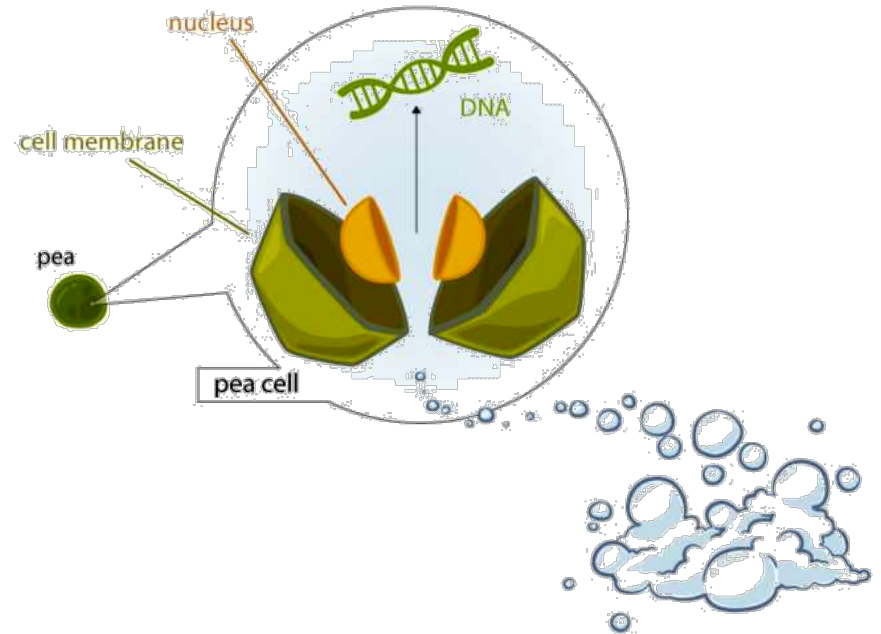
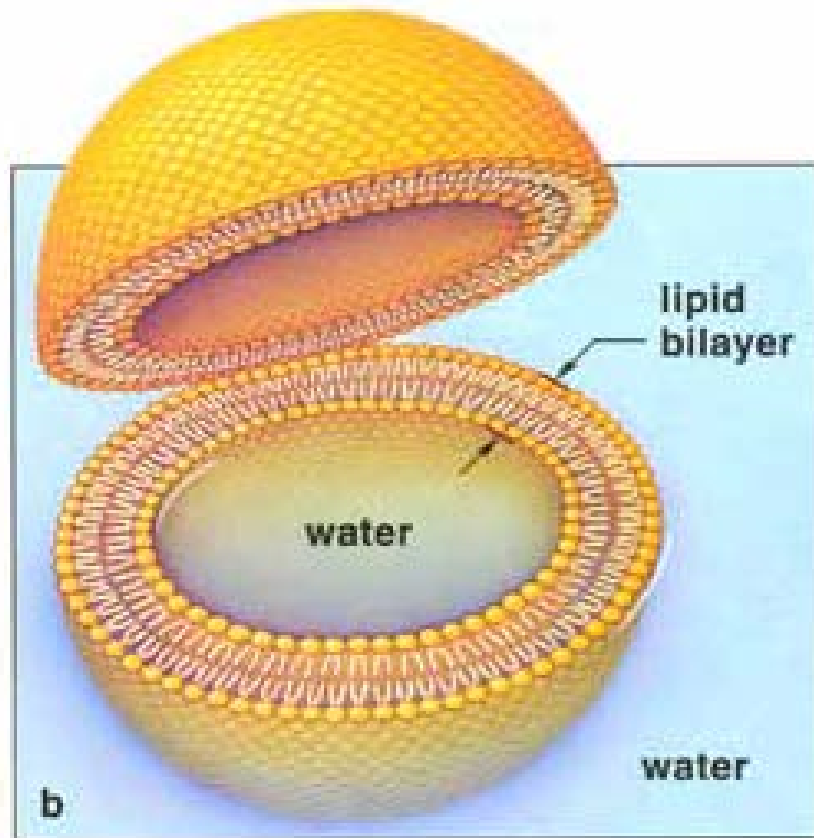
# Η συνολική εικόνα



# Τα επιθηλιακά κύτταρα της στοματικής κοιλότητας



# Οι μεμβράνες

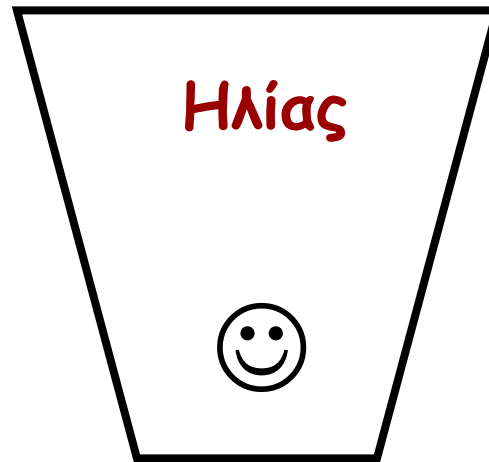


# Τι χρειαζόμαστε

- Πλαστικά ποτηράκια
- Μεσαίοι δοκιμαστικοί σωλήνες
- Γλωσσοπίεστρα ή μπατονέτες
- Πουάρ
- Ξύλινα καλάμακια
- Υγρό καθαρισμού φακών
- Αιθυλική αλκοόλη (παγωμένη )
- Εμφιαλωμένο νερό
- Κρύο διάλυμα εκχύλισης: απαιτούνται νερό, υγρό άχρωμο απορρυπαντικό πιάτων και μαγειρικό αλάτι

# Βήμα 1<sup>ο</sup>

Πάρε ένα πλαστικό ποτήρι και γράψε το όνομα σου





## Ερωτήσεις στη διαδικασία που ακολουθήθηκε :

- Γιατί χρησιμοποιούμε μαγειρικό αλάτι και απορρυπαντικό στο διάλυμα εκχύλισης;
- Γιατί χρησιμοποιούμε υγρό καθαρισμού φακών ;
- Γιατί το διάλυμα εκχύλισης πρέπει να είναι κρύο;
- Γιατί χρησιμοποιούμε παγωμένη αλκοόλη;
- Πιστεύεις ότι στην επιφάνεια επαφής διαλύματος – αιθανόλης, συγκεντρώνεται μόνο το DNA; Γιατί;

# Κι άλλες ερωτήσεις

- Μπορεί το υλικό που πήραμε με την παραπάνω διαδικασία να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση ή διάγνωση:
  - Του συνδρόμου Down
  - Του συνδρόμου Klinefelter
  - Του RNA του ιού HIV
  - Της ομόζυγης β-θαλασαιμίας
  - Της χρωμοσωμικής ανωμαλίας που προκαλεί το σύνδρομο Cri du chat
- Τι θα είχε συμβεί αν πριν το πείραμα είχες μασήσει τσίχλα ;
- Στο κυτταρόπλασμα των ευκαρυωτικών κυττάρων αποδεδειγμένα μπορούν να δράσουν ένζυμα που διασπούν το DNA (νουκλεάσες). Τα ένζυμα αυτά διασπούν ξένο DNA που μπορεί να εισέλθει στο κύτταρο. Παρόλα αυτά, σε αρκετές περιπτώσεις, το ξένο DNA δεν διασπάται και προλαβαίνει να εισέλθει στον πυρήνα του κυττάρου, όπου και προστατεύεται. Να προτείνεις μια δόκιμη εξήγηση γιατί αυτό συμβαίνει in vivo και όχι in vitro, όταν έχουν λυθεί οι μεμβράνες του κυττάρου.
- Τι συνιστά κατά τη γνώμη σου ένα μόριο DNA;

# Προτάσεις για συζήτηση με τους μαθητές

- 1. **Σχολιάζουμε τη μεθοδολογία** ( δράση διάφορων ενζύμων - δομή μεμβρανών).
- 2. **Πως θα μπορούσε να αποδειχθεί ότι το υλικό που συλλέξαμε είναι DNA;** (αναφέροντας τα πειράματα των Avery, Mac Cleod και McCarty , την ιχνηθέτηση, τη χρήση χρωστικής που βάφει ειδικά το DNA ).
- 3. **Στην περίπτωση που θέλουμε να παράγουμε μια φαρμακευτική πρωτεΐνη π.χ την ορμόνη ερυθροποιητίνη, μπορούμε να αξιοποιήσουμε το συγκεκριμένο DNA;** (αναφορά στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης - διαφοροποίηση και την κατασκευή cDNA βιβλιοθήκης από κύτταρα ιστού στα οποία παράγεται).
- 4. **Εάν υποθέσουμε ότι το γενετικό υλικό που συλλέξαμε είναι φυτικής προέλευσης π.χ από φράουλες. Μπορούμε να ελέγξουμε αν αυτές είναι γενετικά τροποποιημένες;** (αναφορά στον έλεγχο ύπαρξης συγκεκριμένων γονιδίων πχ ανθεκτικότητας στον πάγο η ανθεκτικότητας στα έντομα - **πως μπορούμε να τα απομονώσουμε** (αποδιάταξη-υβριδοποίηση με ανιχνευτές).
- 5. **Χρησιμοποιώντας μεθόδους γενετικής μηχανικής πως μπορούμε να φτιάξουμε διαγονιδιακά φυτά χρησιμοποιώντας τα παραπάνω γονίδια;** (αναφορά στο πλασμίδιο Ti).

# Ποιος είναι ο σκοπός των διαφόρων σταδίων Α΄

1. Το απορρυπαντικό διασπά τις κυτταρικές μεμβράνες και τον πυρηνικό φάκελο, επειδή διαλύει τα λιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών και του πυρηνικού φακέλου διαταράσσοντας τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις που συγκρατούν τα λιπίδια και τις πρωτεΐνες στις μεμβράνες.
2. Τα ιόντα  $\text{Na}^+$  από το αλάτι του διαλύματος εκχύλισης έλκονται από τις αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες του DNA, εξουδετερώνοντας το ηλεκτρικό τους φορτίο. Αυτή η εξουδετέρωση κάνει τα μόρια του DNA να «κολλούν» μεταξύ τους και να δημιουργούν συσσωματώματα, ενώ απομακρύνονται και οι πρωτεΐνες, που είναι συνδεδεμένες με αυτό DNA (θα διατηρηθούν διαλυμένες στην υδατική φάση).
3. Η πρωτεάση (εδώ: από διάλυμα υγρού φακών) απομακρύνει τις πρωτεΐνες από το DNA.

## Ποιος είναι ο σκοπός των διαφόρων σταδίων Β΄

4. Η προσθήκη κρύας αιθανόλης απομακρύνει τα μόρια του νερού από το DNA και τα συσσωματωμένα μόρια του DNA καθιζάνουν στην επιφάνεια μεταξύ νερού- αιθανόλης, επειδή το DNA δεν είναι διαλυτό στην αιθανόλη. Η αλκοόλη προστίθεται παγωμένη διότι η διαλυτότητα των αλάτων στα υγρά μειώνεται με την πτώση της θερμοκρασίας.
5. Το κρύο διάλυμα εκχύλισης καθυστερεί τις ενζυμικές αντιδράσεις και προστατεύει το DNA από τη δράση των **νουκλεασών** που υπάρχουν πλέον ελεύθερες στο υγρό (μετά τη διάσπαση των κυστιδίων που τις περιείχαν).
6. Το μάσημα τσίχλας διευκολύνει την αποκόλληση επιθηλιακών κυττάρων (σπάζουν με τη μάσηση) αλλά μειώνει το ποσό DNA που παίρνουμε γιατί άθελα μας τα καταπίνουμε. Έχει παρατηρηθεί ότι δίνει πιο καθαρές τις αλυσίδες στη φάση αιθανόλης αλλά σε πολύ μικρότερο ποσοστό.

## Για τον διδάσκοντα

- Η αιθανόλη χρησιμοποιείται για την καθίζηση του DNA. Πρέπει η αιθανόλη να προστεθεί σιγά-σιγά προσεκτικά, ώστε να σχηματιστούν δυο ξεχωριστές φάσεις μια υδάτινη (με τα κυτταρικά συστατικά) και μια με την αιθανόλη, που είναι λιγότερο πυκνή από το νερό.
- Το DNA δε μπορεί πλέον να παραμείνει στην υδάτινη φάση (όπου είναι διαλυτό) και περνά στη φάση της αιθανόλης, στην οποία όμως δεν είναι διαλυτό και «κατακρημνίζεται».
- Μόνο το DNA μπορεί να σχηματίσει ίνες στην αιθανόλη, καθώς το μεν RNA υπάρχει σε πολύ μικρότερα κομμάτια ενώ οι πρωτεΐνες παραμένουν στην υδάτινη φάση μαζί με τα λιπίδια.

Εκτός των άλλων πηγών, αξιοποιήθηκαν οι πολύ καλές προτάσεις των ΕΚΦΕ Αιγάλεω, Ηρακλείου και Αργοστολίου για την ίδια εργαστηριακή άσκηση. Θεωρούμε ιδιαίτερα χρήσιμο να ανατρέξετε σε αυτές για άντληση ποικίλων χρηστικών στοιχείων!

