

Isolering af DNA fra løg

Formål: At isolere DNA fra levende væv.

Teori: Isolering af DNA fra celler er første trin i mange molekylærbiologiske undersøgelser. Denne fremgangsmåde er en meget generel metode, der kan anvendes på mange celletyper, der indeholder en vis mængde DNA. **Princippet i metoden** er at man først ødelægger cellemembraner og kernemembraner med et vaskemiddel for at få DNA ud af kernen og cellen. Derefter opvarmer man DNA for at ødelægge enzymer, som findes i cellen, og som kan nedbryde DNA (DNAaser). Herefter ødelægges man plantevævet, fx cellulose, mekanisk ved at blende det og dermed skære det i stykker. Celledelene adskilles ved at filtrere opløsningen. DNA og opløselige proteiner bliver i den fratrængte væske. Med et enzym fjerner man proteinerne (histoner) som DNA er rullet op omkring, og endelig tilsætter man isafkølet alkohol, som gør at DNA bliver synlig i væsken.

Materialer:

Til at fremstille ekstrakt:

Blender (fælles)

Skarp kniv og spækbræt

Vandbad, 60°C (fælles)

Isbad (fælles)

1 stk 250 ml bægerglas pr gruppe

Kaffefilter

1 stort løg, ca 100 gram

10 ml opvaskemiddel

3 g NaCl (bordsalt)

100 ml demineraliseret vand

Til at adskille DNA fra ekstraktet:

Glasspaltel

Stort reagensglas

6 ml løgvævs ekstrakt

Protease-enzym, NOVO Neutrase (fælles)

9 ml iskold 96% alkohol (hentes i fryseren lige inden brug)

Metode:

Fremstilling af løg-ekstraktet

1. Kom 3 g NaCl og 10 ml opvaskemiddel i et bægerglas. Fyld på til 100 ml med demineraliseret vand.
2. Skær løget i små stykker. Hæld løgstykkerne ned i vaskemiddel/salt-opløsningen.
3. Rør i blandingen, og stil den i et 60°C varmt vandbad i **præcis** 15 min.

Denne behandling nedbryder celle- og kernemembranerne. Vaskemidlet bindes til cellemembranernes fedtstoffer og proteiner, og sørger for, at de ikke længere kan opretholde deres funktion som en del af cellemembranen. Na⁺-ionerne fra saltet binder sig til DNAs negativt ladede fosfatgrupper, og når DNAmolekylet bliver uladet, kan det ikke så let opløses i væsken, og så er det nemmere for os at få fat i det. Ved 60°C ødelægges de enzymer som findes i cellen, og som kan nedbryde DNA.

4. Køl blandingen ned på et isbad i 5 min. Husk jævnligt at røre i blandingen.
(hvis man holder temperaturen på 60°C, vil DNA nedbrydes)
5. Hæld blandingen i en blender, og kød i 5-15 sek. (til vævet er mast). Blendning nedbryder cellevægge og membraner yderligere, hvorved DNA frigøres fra kernen/cellen.
(hvis man blander i for lang tid ødelægges DNA-molekylerne)
6. Filtrer ned i et bægerglas gennem et kaffefilter. Undgå at få skum med ned i væsken i bægerglasset. Væsken (løgvæsken) i glasset indeholder nu opløselige proteiner og DNA.

Adskillelse af DNA fra løg-væsken

1. Hæld 6 ml løg-væske i et stort reagensglas. Tilsæt 2-3 dråber protease (et proteinspaltende enzym) og bland forsigtigt, undgå skumdannelse (protease vil nedbryde opløselige proteiner = histoner i DNA 'et).
2. Hold reagensglasset lidt på skrå (vinkel på ca. 45 grader) og tilsæt 9 ml **iskold** 96% alkohol til løg-væsken ved at hælde alkoholen **forsigtigt** ned langs reagensglassets side. Alkoholen **må ikke blandes** med løg-væsken, men skal lægge sig i et lag oven på løg-ekstraktet. Lad reagensglasset stå uforstyrret i 3-5 minutter.
DNA kan ikke opløses i iskold alkohol, og derfor "bobler" DNA og de sidste proteiner nu ud i væsken. DNA stiger langsomt op i alkoholen som en hvid tåge (ligner nærmest bomuldsvat)
3. Nu kan man vikle DNA op på en glasspatel, ved forsigtigt at dreje spalten rundt lige over grænselaget mellem løgvæsken og alkohol – pas på ikke at føre glasspatlen ned i løgvæsken.

Resultater:

Tegn en skitse af reagensglasset med det udskilte DNA. Forsyn tegningen med pile og betegnelser.

Diskussion/arbejdsspørgsmål:

1. Hvilken virkning har opvaskemidlet på celle- og kernemembraner?
2. Hvilken virkning har saltet som tilsættes og som binder til cellernes DNA-molekyler? Tænk på DNA's rygrad (vangerne) som består af phosphat-molekyler, som er negativt ladede.
3. Hvad er histoner og hvordan fjernes de fra løgcellerne?
4. Hvad sker der når løgblandingen opvarmes til 60°C?
5. Hvorfor afkøles løgblandingen igen, efter at den har været opvarmet til 60°C?
6. Nukleinsyreopløsninger, der fremstilles på denne måde, er ikke særlig rene, men indeholder en del histoner. Men metoden viser de væsentligste principper ved oprensning af DNA fra væv. Hvis DNA'et var helt rent, hvad kunne man så forestille sig at anvende det til?

Konklusion:

DNA fra løg?

