

Forsøgsvejledning

DNA-oprensning

De fleste ved at DNA har form som en snoet trappe, en såkaldt helix-struktur. Men hvordan ser DNA ud for det blotte øje? Det finder man ud af ved at oprense DNA'et. Man kan også teste om DNA opfører sig som en syre, som navnet deoxyribonucleinsyre antyder.

DNA kan i princippet oprenses fra alle typer organismer så længe man har materiale nok, og det oprensede DNA kan efterfølgende analyseres ved forskellige metoder og teknikker, fx ved hjælp af PCR, gelelektroforese, sekventering m.m.

I dette forsøg oprenses DNA fra kiwifrugter. Først nedbryder man materialet mekanisk til mindre dele. Derefter nedbryder man cellernes membraner og cellevæg ved hjælp af opvaskemiddel og salt. Derefter filtreres celleresterne fra cellens DNA og opløste proteiner. Opløste proteiner (herunder histoner) kan fjernes fra DNA ved hjælp af proteaser, og til sidst kan DNA udfældes i iskold ethanol.

Til sammenligning kan man prøve at oprense sit eget DNA fra celler i mundhulen.



Materialer

Kiwifrugter, ca. 100 g pr. gruppe
Opvaskemiddel (ikke koncentreret, ellers må der fortyndes så mængderne passer)
NaCl (husholdningsudgave er tilstrækkelig)
0,9 % saltopløsning (der skal bruges 10 mL pr. elev)
Protease, fx neutrase fra Novozymes
Iskold ethanol (93 % eller 96 %) direkte fra fryseren
Bromthymolblåt (BTB)
Demineraliseret vand
Urteknive
Skærebrætter
10 mL måleglas
250 mL bægerglas
Glasspatler eller café latte skeer (langt skaft)
Engangsplastikkrus
Engangspipetter
100 mL reagensglas + stativ
10-20 mL reagensglas + stativ
Tragte
Ostelærred + sakse
Petriskåle
Blender(e)
Vandbad eller ovn 60° (skal være tændt i forvejen, så temperaturen passer ved forsøgets start)
Isbad (isterninger i koldt vand)



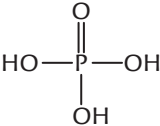
Fremgangsmåde til oprensning af DNA fra kiwifrugt

1. Gør et isvandbad klar.
2. Skær 100 g skrælet kiwifrugt i små stykker, ca. 0,5-1 cm på hvert led.
3. Bland 10 mL opvaskemiddel med 3 g NaCl og fyld op med demineraliseret vand til 100 mL-stregen i et 250 mL bægerglas.
4. Tilsæt kiwistykkerne og bland med ske eller spatel.
5. Sæt kiwi-blandingen i vandbad eller ovn ved 60° i præcis 15 minutter. Rør evt. i blandingen et par gange undervejs. Mens man venter, kan man evt. undersøge sit eget DNA, se punkt 16-20. Det er smart at klassen koordinerer brug af vandbad/ovn, da man senere skal deles om blendere.
6. Sæt kiwi-blandingen i isbad ved 0° i 3 minutter.
7. Flere (evt. alle) grupper hælder nu deres kiwi-blanding i blenderen, og blender ved høj hastighed i 5 sekunder.
8. Det blendede materiale fordeles igen mellem grupperne i deres bægerglas.
9. Hver gruppe forer en tragt med 1-2 lag ostelærred og filtrerer deres kiwiblend og lader det dryppe ned i et stort reagensglas.
10. Man filtrerer så længe der er tid/man orker, eller indtil man har mindst 20 mL kiwifiltrat.
11. Tilsæt derefter 1 dråbe protease pr. 2 mL filtrat og omrør med spatel/ske.
12. NU KOMMER DET SVÆRESTE PUNKT. Hold reagensglasset skråt og lad iskold ethanol trille langsomt og forsigtigt ned langs reagensglassets inderside så ethanolen lægger sig som en fase oven på kiwifiltratet. Brug maks. det samme volumen ethanol som der er kiwifiltrat.
13. Vend forsigtigt reagensglasset lodret, og lad det stå helt stille i 2 minutter. DNA skulle gerne stige op i ethanollaget som en luftholdig hvid sky.
14. Brug spatel/ske til at få fat i DNA'et og overfør det til en petriskål.
15. Test om DNA reagerer som en syre ved at hælde et par dråber BTB på det oprensede DNA.

Fremgangsmåde til oprensning af eget DNA

16. Overfør 10 mL 0,9 % saltvand til et engangsplastikkrus.
17. Skyl munden i saltvandet i minimum 30 sekunder – spyt vandet tilbage i kruset.
18. Overfør 1 mL opvaskemiddel til et reagensglas.
19. Overfør mundskyllet/saltvandet til reagensglasset.
20. Bland forsigtigt de to faser ved at holde en finger for munden af reagensglasset og vende det nogle gange i løbet af 2-3 minutter.
21. Tilsæt ethanol som beskrevet i punkt 12 og følg resten af vejledningen til oprensning af DNA fra kiwifrugt.

Efterbehandling

1. Til at isolere DNA fra kiwi opløses 3 g NaCl i 100 mL opløsning (opvaskemiddel + vand). Beregn koncentrationen af NaCl i opløsningen.
2. Forklar omhyggeligt hvad der sker i de enkelte trin i oprensning af DNA fra kiwi og hvorfor vi udfører disse trin.
3. Hvad kan man udlede om DNA's egenskaber på baggrund af de behandlinger, det udsættes for i denne øvelse?
4. I en kiwicelle er denne korte DNA-sekvens fundet: TACCGGTTAAGATCA. Hvilken DNA-streng passer over for dette udsnit?
5. Et DNA-nucleotid består af fosfat, deoxyribose og en nitrogenholdig base. Angiv reaktionstypen for den reaktion der finder sted, når den nitrogenholdige base binder sig til deoxyribose og opskriv reaktionen.
6. Angiv tilsvarende reaktionstypen og opskriv reaktionen hvor fosfat binder sig til deoxyribose, idet du antager at fosfat har følgende struktur (phosphorsyre):

7. Hvilken type binding dannes ved denne reaktion?
8. Forklar hvordan de to DNA-streng i et DNA-molekyle holdes sammen.
9. Reagerede DNA'et surt eller basisk ved tildrypning af syre-base-indikatoren BTB?
10. Hvorfor ligner dit eget DNA kiwiens DNA?