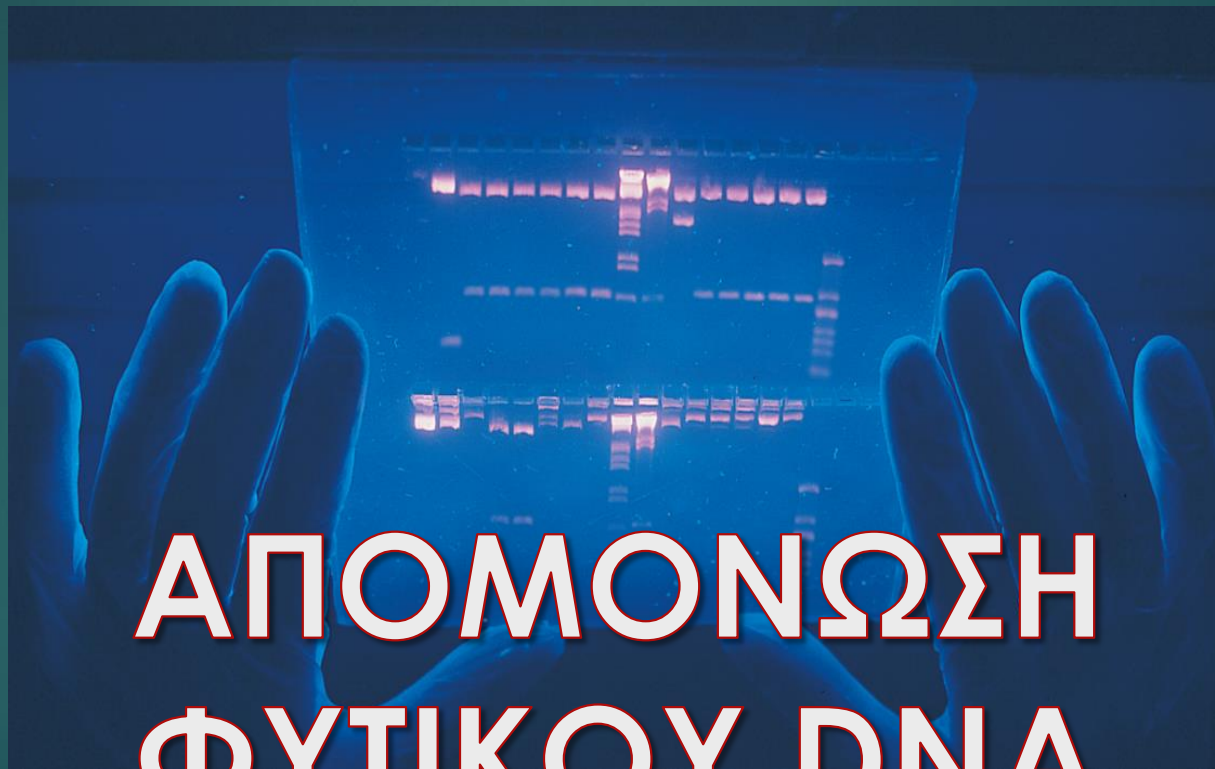


ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ  
ΠΟΛΥΤΕΧΝΙΚΗ ΣΧΟΛΗ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ  
ΦΥΤΙΚΟΥ DNA

# ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΦΥΤΙΚΟΥ DNA



- ▶ **Απομόνωση DNA:** είναι μια διαδικασία εξαγωγής του DNA από τα διάφορα δείγματα.
- ▶ **Ο στόχος:** είναι να διαχωριστεί το DNA που βρίσκεται στον πυρήνα του κυττάρου από τα άλλα κυτταρικά συστατικά.

# ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ DNA

Είναι απαραίτητη για τη γενετική ανάλυση που χρησιμοποιείται για:

**ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ:** Το DNA είναι απαραίτητη πρώτη ύλη για τα περισσότερα πειράματα μοριακής βιολογίας / βιοτεχνολογίας όπως η εισαγωγή του DNA σε κύτταρα και ζώα ή φυτά για διαγνωστικούς σκοπούς (gene cloning)

**ΙΑΤΡΙΚΗ:** διαγνωστικούς σκοπούς

**ΙΑΤΡΟΔΙΚΑΣΤΙΚΗ:** ανάκτηση και ταυτοποίηση DNA για τον προσδιορισμό των ατόμων, (πχ βιαστές, ατύχημα ή πολεμικά θύματα), και προσδιορισμός πατρότητας.

## Η επιλογή της κατάλληλης τεχνικής απομόνωσης DNA καθορίζεται από πολλές παραμέτρους, όπως:

- ▶ το αρχικό υλικό (π.χ. κύτταρα, ιστός, αίμα),
- ▶ το μέγεθος DNA
- ▶ το είδος (π.χ. χρωμοσωμικό, πλασμιδιακό, μιτοχονδριακό, ιικό κ.λπ.)
- ▶ την ποιότητα του DNA που επιθυμούμε να απομονώσουμε.
- ▶ Τον χρόνο και το κόστος

# ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

**A. Πηγή:** DNA μπορεί πρακτικά να απομονωθεί από οποιοδήποτε υλικό περιέχει εμπύρηννα κύτταρα (φυτά, ζώα, μικρόβια)

Αλλά και κύτταρα από βιοψία τροφοβλάστης, μουσειακά εκθέματα, ρίζες τριχών, δόντια, οστά, βιοψίες ιστού σε κύβους παραφίνης κ.ά.

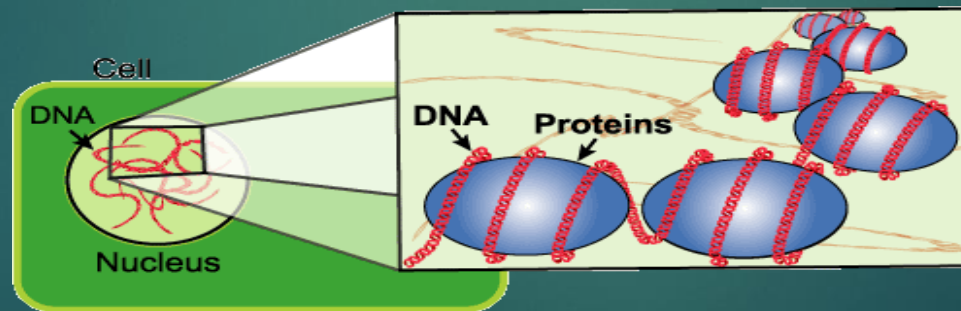
**B. Ηλικία δειγμάτων:** νωπά ή χρόνια αποθηκευμένο. Το αποθηκευμένο δείγμα μπορεί να προέλθει από: Αρχαιοθετημένα δείγματα ιστών, Κατεψυγμένο αίμα ή ιστός (υλικό βιοψίας), οστά ή ιστούς από εκταφή και αρχαίο ανθρωπινό δείγμα.

Αποξηραμένες κηλίδες αίματος

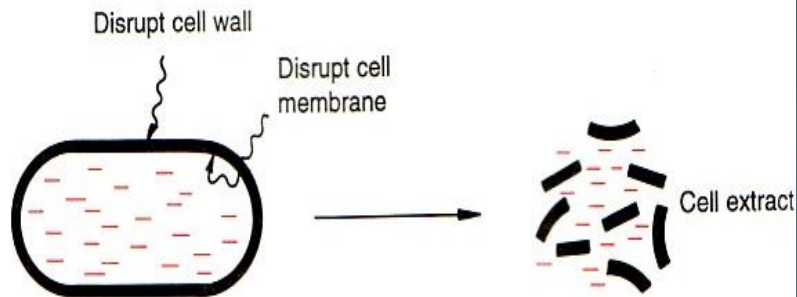


# ΒΑΣΙΚΑ ΣΤΑΔΙΑ ΤΗΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ DNA

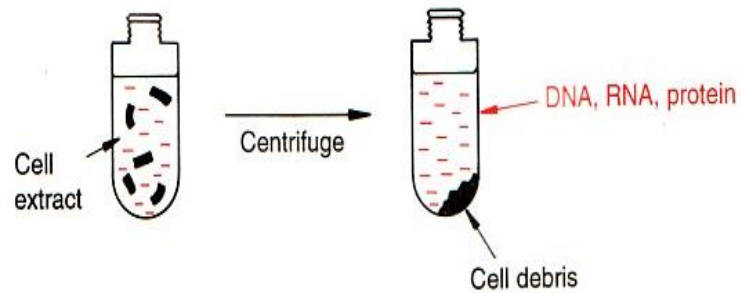
1. Λύση των κυτταρικών μεμβρανών και της μεμβράνης του πυρήνα για να ελευθερωθεί το DNA στο διάλυμα.
2. Αποικοδόμηση κυτταρικών πρωτεϊνών με επίδραση πρωτεολυτικών ενζύμων
3. Διαχωρισμός του DNA από τις πρωτεΐνες
4. Καθαρισμός του DNA από υπολείμματα αλάτων με διάλυμα παγωμένης αιθανόλης 70%
5. Ανασύσταση του DNA σε διάλυμα TE (Tris EDTA)



(a) Cell lysis



(b) Centrifugation to remove cell debris



- ▶ Διαχωρισμός DNA από τα υπόλοιπα κυτταρικά συστατικά
- ▶ Αποφυγή αποδιάταξης DNA
- ▶ Απενεργοποίηση αμέσως των ενδογενών νουκλεασών (DNAσες)

# Πειραματικό μέρος

## Όργανα - Υλικά

- ▶ Ομογενοποιητής-γουδάκια (pestles)
- ▶ Σωληνάκια erpendorf
- ▶ Ψυχόμενη φυγόκεντρος
- ▶ Αυτόματες μικροπιπέτες ακριβείας
- ▶ Ακροφύσια (tips) διαφόρων ποσοτήτων
- ▶ Υδατόλουτρο 65°C
- ▶ Υδατόλουτρο 37°C
- ▶ Γάντια

## Διαλύματα

- ▶ Διάλυμα 2 x CTAB buffer:  
(2% CTAB, 100mM Tris-HCl pH 8.0, 20mM EDTA, 1.4M NaCl)
- ▶ Χλωροφόρμιο Ισοαμυλική
- ▶ Αιθανόλη απόλυτη
- ▶ Αιθανόλη 70%
- ▶ Διάλυμα TE ή SDW ( Sterile Distilled Water)



# Πειραματική Διαδικασία

Προσοχή: Γάντια απαιτούνται καθ' όλη τη διάρκεια της άσκησης γιατί το χλωροφόρμιο είναι τοξική ουσία.

## 1) ΔΙΑΡΡΗΞΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ: ΜΗΧΑΝΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

Χρησιμοποιείται συνήθως σε συνδυασμό με άλλες τεχνικές

1. Συλλέγουμε το βιολογικό μας υλικό ( ένα φύλλο για κάθε ομάδα).
2. Τοποθετούμε το φύλλο σε σωλήνα erpendorf 1.5ml και ομογενοποιούμε, χρησιμοποιώντας το ειδικό εργαλείο με μερικές δυνατές περιστροφές.



## 2. ΔΙΑΡΡΗΞΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ: ΜΗ ΜΗΧΑΝΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

3. Προσθέτουμε στο ομογενοποίημα 200 μl lysis buffer και αναδεύουμε δυνατά με το ειδικό όργανο αναταράξεως (vortex).

### Διάλυμα ομογενοποίησης / λύσης (Lysis Buffer)

1. **NaCl**
2. **Tris** –HCl: Trimethamine
3. **EDTA** : Ethylenediaminetetraacetic
4. **SDS** : Sodium dodecyl sulfate
5. **proteinase K**



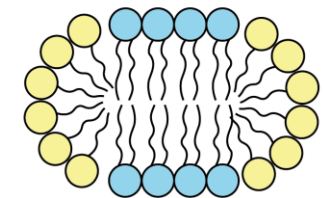
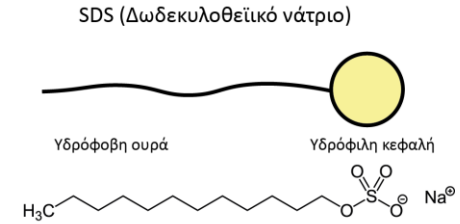
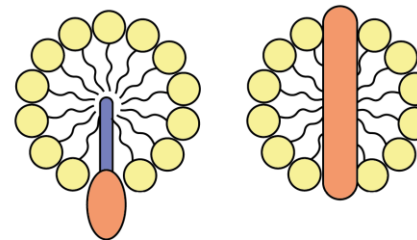
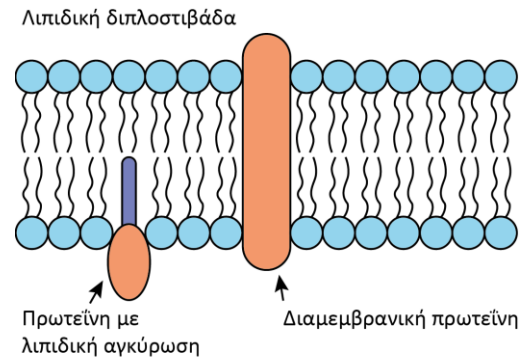
# Ρόλος διαλύματος λύσης

- ▶ **NaCl** : διατηρεί την ωσμωτικότητα του διαλύματος ώστε να μη γίνει απότομη ρήξη των μεμβρανών κατά τη διάρκεια της λύσης των κυττάρων
- ▶ **Tris** (Trimethamine) : διατηρεί το pH σε ουδέτερη περιοχή (~ 7.3)
- ▶ **EDTA** (Ethylenediaminetetraacetic - Αιθυλενοδιαμινο-τετραοξικό οξύ ) : παρεμποδίζει τη δράση ενδονουκλεασών.  
Το EDTA είναι ένας χηλικός παράγοντας που δεσμεύει δισθενή ιόντα, όπως  $Mg^{2+}$  και  $Ca^{2+}$ , που είναι απαραίτητα για τη δράση των νουκλεασών που διασπούν το DNA.
- ▶ **SDS** (Δωδεκυλοθειϊκό νάτριο )
- ▶ **Πρωτεϊνάση K** (proteinase K) : δρά ως πρωτεάση και απενεργοποιεί τις ενδογενείς νουκλεάσες (DNAσες)

# Ο τρόπος δράσης του SDS

Δρα ως αποδιατακτικός παράγοντας,  
διαταράσσοντας τους δεσμούς μεταξύ των πρωτεϊνών

- ▶ 1. Το SDS απομακρύνει τις ιστόνες από τα μόρια του DNA.
- ▶ 2. Το SDS διασπά τη συνοχή των φωσfolιπιδίων και δημιουργεί σύμπλοκα με τις μεμβρανικές πρωτεΐνες καθιστώντας τις υδατοδιαλυτές.
- ▶ 3. Το SDS δεσμεύει επίσης και τις μη μεμβρανικές υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες. Οι δεσμευμένες με SDS πρωτεΐνες χάνουν την τριτοταγή δομή τους και επομένως τη λειτουργικότητά τους.



4. Επωάζουμε το ομογενοποίημα για τουλάχιστον 5 λεπτά στους 65 °C.



65 °C



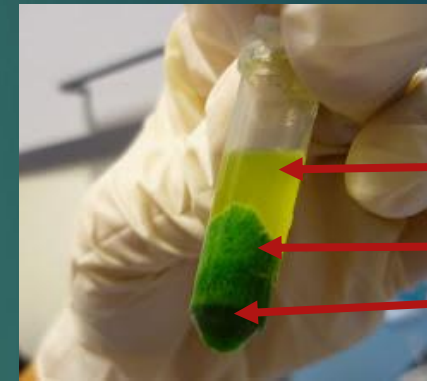
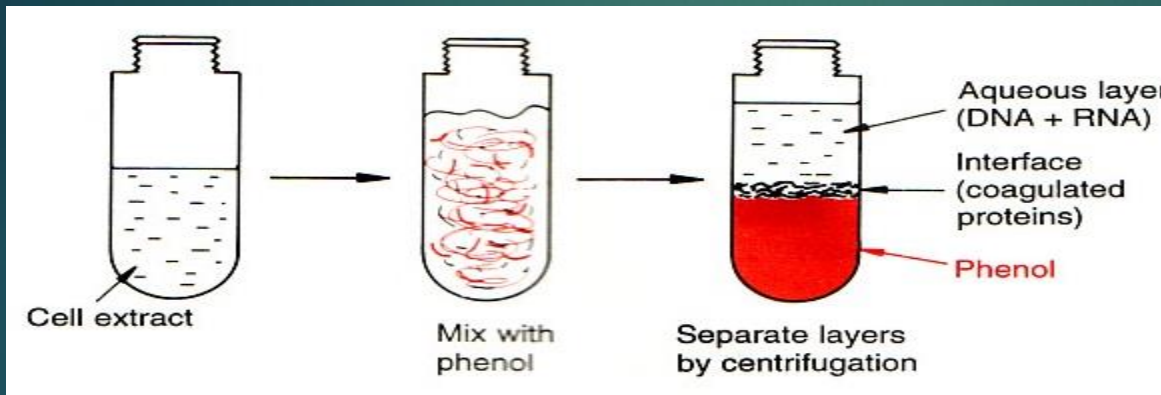
## 2. Διαχωρισμός του DNA από τις πρωτεΐνες

### Μέθοδοι διαχωρισμού

- ▶ με την προσθήκη διαλυμάτων αλάτων υψηλής ιοντικής ισχύος και απόλυτης (100%) αιθανόλης,
- ▶ με οργανική εκχύλιση με διάλυμα φαινόλης - χλωροφορμίου,
- ▶ με πρόσδεση σε μεμβράνη ιοντοανταλλαγής
- ▶ με πρόσδεση σε μαγνητικά σφαιρίδια.

# Διαχωρισμός με οργανική εκχύλιση με διάλυμα φαινόλης – χλωροφορμίου – ισοαμυλικής

- Φαινόλη: μετουσιώνει τις πρωτεΐνες και στη συνέχεια διαλυτοποιεί τις μετουσιωμένες πρωτεΐνες



Το χλωροφόρμιο και η φαινόλη προκαλούν την επιφανειακή αποδιάταξη των πρωτεϊνών, ενώ η ισοαμυλική αλκοόλη μειώνει τη δημιουργία αφρού και σταθεροποιεί την ενδιάμεση ζώνη (μεσόφαση).  
Η φυγοκέντρωση θα κατακρημνίσει τις πρωτεΐνες.  
Το υπερκείμενο περιέχει το DNA.

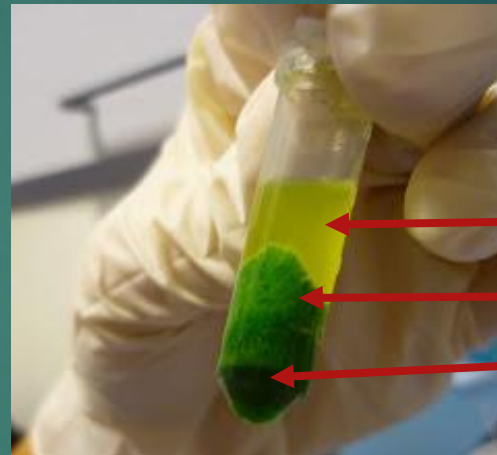
4. Προσθέτουμε ίσο όγκο 200μl διάλυμα χλωροφορμίου - ισοαμλικής και το αναδεύουμε δυνατά με το ειδικό όργανο αναταράξεως.
5. Φυγοκεντρούμε στις 16,000 στροφές/λεπτό (rpm) για 5 λεπτά.





6. Συλλέγουμε το υπερκείμενο (υδάτινη φάση) σε ένα καθαρό σωλήνα erpendorf 1.5 ml.

\* Αν η μεσόφαση (η περιοχή μεταξύ οργανικής και υδάτινης φάσης) έχει απομακρυνθεί πλήρως, τότε προχωρούμε στο στάδιο 8. Αν όχι, τότε επαναλαμβάνουμε τα στάδια 6-7.



ΥΔΑΤΙΝΗ ΦΑΣΗ

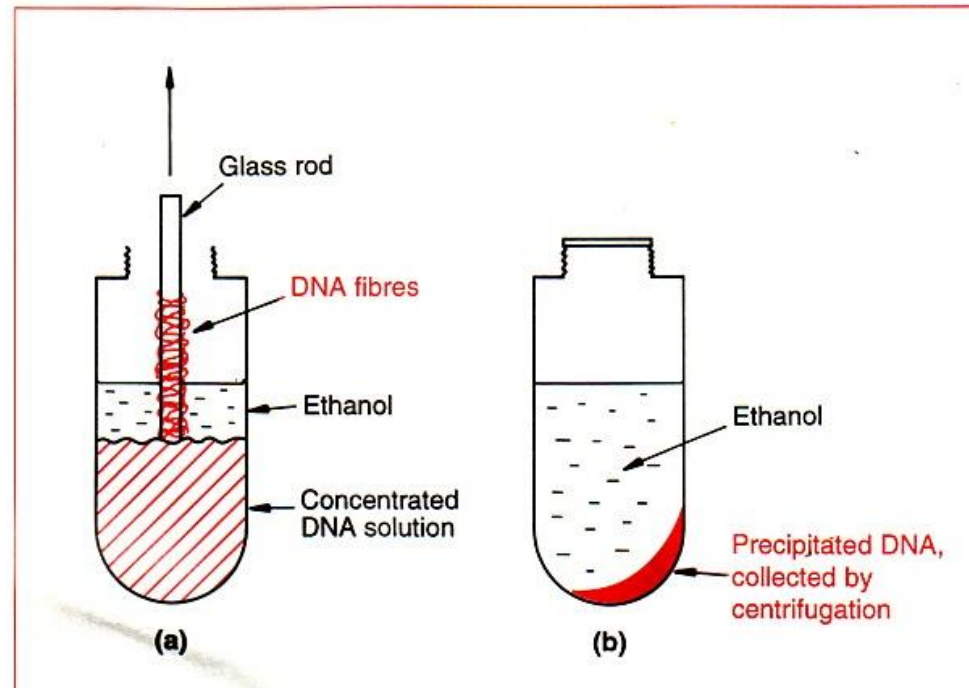
ΜΕΣΟΦΑΣΗ

ΟΡΓΑΝΙΚΗ  
ΦΑΣΗ

# 3. Κατακρήμνιση του DNA

Η προσθήκη της αιθανόλης παρουσία αλάτων προκαλεί δομικές αλλαγές στο μόριο του DNA (καθίσταται αδιάλυτο), με αποτέλεσμα να κατακρημνίζεται εκτός διαλύματος και όταν η ποσότητά του είναι μεγάλη να γίνεται ορατό σαν μια λευκή κλωστή.

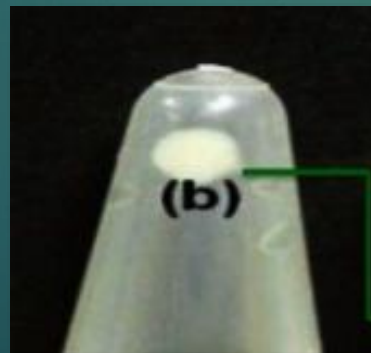
Μετά από φυγοκέντρηση το DNA βρίσκεται ως ίζημα στον πυθμένα του σωληναρίου και το υπερκείμενο απομακρύνεται.




8. Προσθέτουμε 600μl παγωμένης αιθανόλης ή ισοπροπανόλης (περίπου τριπλάσιο όγκο).
9. Επωάζουμε για 20 λεπτά στους  $-20^{\circ}\text{C}$ . Παρατηρούμε την κατακρήμνιση του DNA με τη μορφή πολύ λεπτών ινών



9. Φυγοκεντρούμε για 15 λεπτά maximum στροφές/λεπτό στους  $4^{\circ}\text{C}$ .
10. Το DNA θα πρέπει να εμφανιστεί με τη μορφή λευκού ιζήματος στον πυθμένα του σωλήνα.

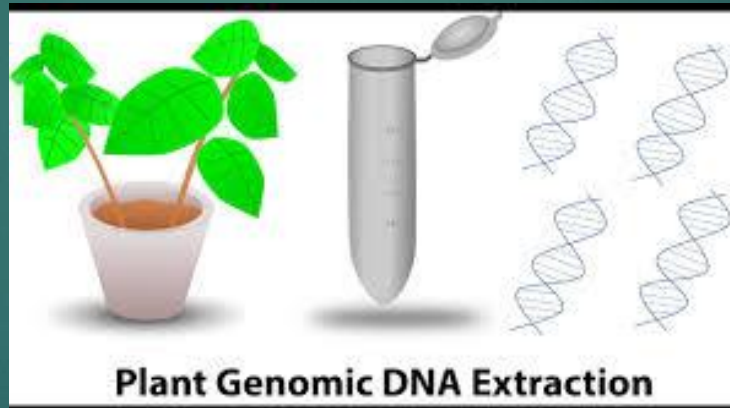


**DNA ιζημα (pellet)**

- 
9. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και «ξεπλένουμε» το DNA σε 200μl 70% αιθανόλη.
  10. Φυγοκεντρούμε σε maximum στροφές/λεπτό για 5 λεπτά και απομακρύνουμε το υπερκείμενο.
  11. Ξηραίνουμε το DNA στο ειδικό δοχείο κενού για 2-3 λεπτά και το διαλύουμε ανάλογα με την ποσότητά του σε:
    - TE διάλυμα (περίπου 50-100 μl), αν πρόκειται να αποθηκευτεί στους  $-30^{\circ}\text{C}$  για μεγάλο χρονικό διάστημα
    - Αποστειρωμένο νερό (περίπου 50-100 μl) αν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί σύντομα για περαιτέρω ανάλυση

# Απομόνωση φυτικού DNA

<https://www.youtube.com/watch?v=9-olhcH4NI4>



## Βιβλιογραφία

1. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor New York, USA.
2. Ashburner, M. (1989). *Drosophila: A Laboratory Handbook* (Protocol 47: Isolation of DNA from adult flies). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.
3. Σκούρας, Ζ. (1993). *Μόρια και γονίδια. Μια πρακτική προσέγγιση*. Εκδόσεις Art of Text, Θεσσαλονίκη.