

Isolering af DNA fra kiwi



Formål:

At afprøve en metode til isolering af DNA fra et levende væv.

Indledning:

Isolering af DNA fra celler er første trin i mange molekylærbiologiske undersøgelser. Nedenstående 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 mekanisk nedbryder vævet, derefter nedbryder man eventuelle cellevægge, cellemembraner og kernemembraner med et vaskemiddel.

Cellefragmenter adskilles ved filtration. DNA og opløselige proteiner forbliver i det frafiltrerede væske. Med et enzym fjerner man proteinerne, og endelig udfældes DNA i iskold ethanol.

Materialer:

- 2 kiwifrugter
- Ca. 3 g salt
- 100mL vand
- 10mL opvaskemiddel
- Spatel el.lign. til at røre i blandingen med
- Grønsagskniv og spækbræt
- Stavblender
- Kaffefilter
- Bægerglas
- Vandbad 60 grader
- Isbad
- Reagensglas
- Neutrased (enzym)
- 6 mL iskold 96% ethanol

Fremgangsmåde:

1. Afvej 10 gr opvaskemiddel i et bægerglas. Tilsæt 3 g NaCl til opvaskemidlet. Fyld op til 100 ml med vand. Rør lidt rundt.
2. Skær kiwien i små stykker. Hæld kiwistykkerne i bægerglasset med vaskemiddel / saltopløsningen.
3. Rør i blandingen, og stil den i et 60 °C varmt vandbad i **præcis 15 min.**
Forklaring: Denne behandling nedbryder cellemembranerne. Vaskemidlet danner komplekser med membranernes fedtstoffer (fosfolipider) og proteiner. Herefter vil fedtstofferne og proteinerne fælde ud af opløsningen. Na⁺-ionerne vil binde sig til DNA's negativt ladede fosfatgrupper, og på den måde beskytte DNA'et. Ved 60 °C vil de evt. forekommende DN'aser, der ellers kunne tænkes at nedbryde DNA, denaturere. Hvis man holder temperaturen på 60 °C i længere tid, vil DNA nedbrydes.

4. Køl blandingen ned på et isbad i 5 min. Husk jævnligt at røre i blandingen.
5. Blend blandingen i bægerglasset med en stavblender, og kør i **5 sek.** ved høj hastighed.
Forklaring: Blendning nedbryder cellevægge og membraner yderligere, hvorved DNA frigøres. Hvis man blander i længere tid, kan man risikere at ødelægge DNA-molekylerne.
6. Filtrer ned i et nyt bægerglas gennem **to** kaffefiltre (der er sat oveni hinanden, da ét kaffefilter let går i stykker). Undgå at få skum med ned i kaffefiltret. Ekstraktet indeholder nu opløselige proteiner og DNA.
7. Fyld reagensglasset halvt op med kiwiekstrakt. Tilsæt 3 dråber neutrasede. Tilsæt derefter lige så meget iskold 96 % ethanol som I har kiwi ekstrakt ved at holde glasset skråt og forsigtigt hælde ethanolen ned langs glassets side. Ethanolens skal ikke blandes med kiwiekstraktet, men skal lægge sig i et lag oven på. Lad glasset stå uforstyrret i 2-3 minutter.
Forklaring: DNA er uopløselig i iskold ethanol. Der vil fremkomme nogle bobler, mens de resterende proteiner opløses. Efter lidt tid vil man se, hvordan DNA langsomt stiger op i alkoholen, som en hvid tåge (ligner lidt bomuldsvat).
8. Tag et billede af DNA'et i reagensglasset og sæt ind herunder inden du gemmer øvelsesvejledningen på din computer (kan hentes på dette modul i Lectio).

Billede: