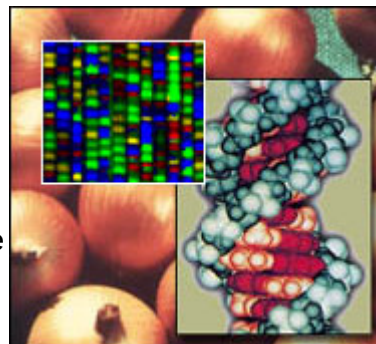

Isolering af DNA fra løg

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



Materialer

Til at fremstille løg ekstrakt:

Skarp grøntsagskniv og spækbræt

100 g løg (brug et stort løg, oftest polyploide

3 g NaCl (bordsalt)

100 ml destilleret vand

10 ml Engangssprøjte

10 ml opvaskemiddel (af den billige ikke-koncentrerede slags)

Vandbad, 60 °C

Reagensglasstativer

Termometer

Isbad

Blender

Kaffefilter

2 stk 250 ml bægerglas

1 stk 100 ml måleglas

Til at adskille DNA fra løg ekstraktet:

Stort reagensglas

6 ml løgvævs ekstrakt

Protease, Neutrase® fra Novozymes

Glasspatel eller lignende glas stav, gerne træpind

9 ml iskold 96% ethanol. (Det er vigtigt at anvende 96% alkohol. Placer alkoholen i fryseren et døgn før forsøget. Alkoholen skal først tages ud lige før den skal bruges)

Alternativt kan bruges husholdningssprit (93 %) eller propan-2-ol (isopropyl alkohol), ligeledes iskold fra fryser.

Fremgangsmåde

Fremstilling af løgekstraktet

1. I 100 ml måleglas tilsættes 3 g salt (1 stor teskefuld) og 10 ml opvaskemiddel (1 spiseskefuld). Fyld op med vand til 100 ml og bland godt.
2. Skær løget i små stykker, kantlængde ca. 5 mm. Hæld løgstykkerne i et bægerglas, og overhæld dem med vaskemiddel/saltopløsningen
3. Rør i blandingen, og stil den i et 60 °C varmt vandbad i præcis 15 min.

Note: Denne behandling nedbryder cellemembranerne. Vaskemidlet danner komplekser med membranernes fedtstoffer (fosforlipider) og proteiner. Herefter vil fedtstofferne og proteinerne fælde ud af opløsningen. Na⁺ ionerne vil binde sig til DNA's negativt ladede fosfatgrupper. Ved 60 °C vil de evt. forekommende DNA-ser, 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. Hæld blandingen i en blender, og kød i max 3 sek. ved høj hastighed.

Note: Blendning nedbryder cellevægge og membraner yderligere, hvorved DNA frigøres. Hvis man blander i længere tid, vanskeliggøres DNA oprensningen.

6. Filtrer ned i et bægerglas gennem et kaffefilter i en tragt. Undgå at få skum med ned i filtratet.

Note: Filtratet indeholder nu opløselige proteiner og DNA. Filtratet kan eventuelt opbevares 1 - 2 døgn i køleskabet

Adskillelse af DNA fra løgekstraktet

7. Fyld et 20 ml reagensglas en tredjedel op med løgekstrakt. Tilsæt 10 dråber Neutrase og bland godt. Ryst evt. glasset forsigtigt, så det fremkommer bobler.

Note: Proteasen i Neutrase vil nedbryde de proteiner, DNA er viklet op om (histoner)

8. Tilsæt 5 - 6 ml iskold ethanol til reagensglasset med løgekstrakt/enzym-blanding. Hold reagensglasset skråt og hæld forsigtig ethanolen ned langs reagensglasset side. Ethanolen må ikke blandes med løgekstraktet, men skal lægge sig i et lag oven på løgekstraktet. Lad reagensglasset stå uforstyrret i 10-15 minutter.

Note: DNA er uopløselig i iskold ethanol. Der vil fremkomme nogle bobler, mens de resterende proteiner opløses. DNA vil fælde ud i løgekstraktet og man vil se, hvordan DNA langsomt stiger op i alkoholen som en hvid tåge (ligner nærmest bomuldsvat)

9. Nu kan man forsøge at vikle DNA op på en glasspatel eller en træpind, ved forsigtigt at dreje spatlen rundt lige over grænselaget mellem vaskemiddel og alkohol - pas på ikke at føre glasspatlen ned i vaskemidlet. Vær meget forsigtig under opviklingen, ellers ødelægges man de fine DNA-tråde.

Sikkerhedsregler.

- Hvis der spildes enzym tørres det op med vand med det samme, for at undgå dannelse af enzymstøv.
Man skal undgå at indånde enzymstøv, da det kan fremkalde allergisk reaktion, såsom astma og høfeber.
- Undgå, at der dannes aerosoler (små væskedråber) af enzymer, da det kan fremkalde allergisk reaktion. Derfor må enzymerne aldrig anvendes på sprayform.
- Undgå at få enzym på huden og i øjnene. Hvis det sker ved et uheld, skal der skylles med rigelige mængder vand.
- I øvrigt henvises til de sikkerhedsanvisninger, der følger med enzymet ved levering.



Flere muligheder:

Man kan overføre DNA ét til et objektglas, farve med acetoocein og derefter kan det mikropieres.

Man kan suge DNA ét op med en pipette og opløse det i 4 % NaCl opløsning. Herefter kan man udføre en gelelektroforese på opløsningen, fx med kit fra NCBE.

I stedet for løg kan anvendes fx kalvebrisler eller kiwifrugt.

Vigtig note: Nucleinsyreopløsninger, der fremstilles på denne måde, er ikke særlig rene, man må forvente, at der specielt forekommer en del histoner i det, man til slut tror, er rent DNA. Men metoden viser de væsentligste principper ved ekstraktion af DNA fra væv.