



Eksperiment

Oprensning af DNA

Baseret på siderne 105-107

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.



Kilde: Figur 130
Bioteknologi A HTX bind 1.
Illustration: Claus Lunau

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 og 10-20 mL reagensglas + stativ
- Tragte
- Ostelærred + sakse
- Petriskåle
- Blender(e)
- Vandbad eller ovn 60 °C (skal være tændt i forvejen, så temperaturen passer ved forsøgets start)
- Isbad (isterninger i koldt vand)



Kilde: Peter Kotoff/Shutterstock.com



Fremgangsmåde til oprensning af DNA fra kiwifrugt

1. Gør et isvandbad klar.
2. Skær 100 g skrællet 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 °C 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 °C 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, filtrerer deres kiwiblanding 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 kiwifiltratet.
13. Vend forsigtigt reagensglasset lodret, og lad det stå helt stille i 2 minutter. DNA'et 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

1. Overfør 10 mL 0,9 % saltvand til et engangsplastikkrus.
2. Skyl munden i saltvandet i minimum 30 sekunder – spyt vandet tilbage i kruset.
3. Overfør 1 mL opvaskemiddel til et reagensglas.
4. Overfør mundskyllet/saltvandet til reagensglasset.
5. 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.
6. Tilsæt ethanol som beskrevet i punkt 12 og følg resten af vejledningen til oprensning af DNA fra kiwifrugt.



Efterbehandling

1. Forklar omhyggeligt hvad der sker i de enkelte trin i oprensning af DNA fra kiwi, og hvorfor man udfører disse trin.
2. Hvad kan man udlede om DNA's egenskaber på baggrund af de behandlinger, det udsættes for i dette eksperiment?
3. I en kiwicelle er denne korte DNA-sekvens fundet: TACCGGTTAAGATCA. Hvilken DNA-streng passer over for dette udsnit?
4. Forklar hvordan de to DNA-streng i et DNA-molekyle holdes sammen.
5. Reagerede DNA'et surt eller basisk ved tildrypning af syre-base-indikatoren BTB?
6. Hvorfor ligner dit eget DNA kiwiens DNA?