

Ekstrakcija molekule DNK

Vaja pri biologiji

Profesor: prof. Gregor Križ
Avtor: Anton Luka Šijanec, 1. a

10. April 2020

Povzetek

V tej vaji bomo spoznali enega izmed načinov ekstrakcije DNK iz sadja s pomočjo encimov. Cilj ekstrakcije je izločiti DNK vse do točke, ko je viden s prostim očesom.

Kazalo vsebine

1	Uvod	1
2	Priprava	1
2.1	Pripomočki, sestavine in orodja	1
2.1.1	Pripomočki	1
2.2	Navodila za izvedbo	2
2.2.1	Postopek	2
2.2.2	Dodatne opombe	2
3	Potek poizkusa in rezultat	2
4	Vprašanja in odgovori	2
5	Viri in literatura	3

1 Uvod

Velik del znanstvenih raziskav na področju biologije predstavlja genetika, vendar v šoli, kar se tiče prakse, delamo zelo malo. Ta vaja je zato zelo primerna za raziskavo molekule DNK, saj si lahko boljše predstavljamo njeno zgradbo in delovanje in jo tako tudi prvič vidimo izolirano.

2 Priprava

2.1 Pripomočki, sestavine in orodja

Vajo je možno izvesti z dokaj običajnimi sestavinami in z uporabo orodij, ki jih najdemo doma.

2.1.1 Pripomočki

- 2 mL zmečkanega kivija (približno dve žlički)
- Terilnica s pestilom
- 10 mL raztopine 1 (10 mL detergenta, 10 g kuhinjske soli, 90 mL vode)
- Alkohol (2 mL)
- Ananasov sok (5 kapljic)
- Filter papir za kavo
- Lesena palčka
- Epruveta (manjši kozarček)
- Lij
- Žlička

2.2 Navodila za izvedbo

2.2.1 Postopek

- Kivi strite v terilnici.
- V kozarec prenesi 2 žlici kivija in dodaj 10 mL raztopine 1. V kolikor boste imeli vzorca več, ustrezno povečajte tudi količino raztopine 1. Npr. 6 žlic kivija, 30 mL raztopine. Količino izberite glede na to kateri kozarec imate doma.
- Suspenzijo precedite s pomočjo lija in filter papirja v ozek kozarec.
- Dodajte pet kapljic ananasovega soka, ki vsebuje proteazne encime.
- Nagnite kozarec s filtratom in previdno dolijte nekaj mililitrov ledeno hladnega etanola. Pri tem pazite, da se alkohol in filtrat ne mešata! Če boste zmešali obe tekočini, DNK ne bo vidna.
- Postavite na pult in opazujte, kaj se dogaja.
- Poskus foto dokumentirajte (tudi video). Slike priložite v poročilo.

2.2.2 Dodatne opombe

- Za izolacijo lahko uporabite praktično katerokoli sadje ali zelenjavo (špinača, paradižnik, solata, banana, ...) Poskusite z različnimi živili. Lahko naredite tudi primerjavo. Ni potrebe, da zmečkate cel kivi (navadno en kivi zadostuje za delo celotnega razreda). Je pa res, da več kot boste dali vzorca, več DNK boste lahko izolirali. Vendar več vzorca res pomeni, da moraš dati tudi več raztopine 1 (detergent, sol, voda)
- V kolikor doma nimate terilnice za tretje začimb, lahko namesto nje uporabite krožnik in vilice, lahko pa mečkate v vrečki ali kozarcu.
- Alkohol mora biti obvezno LEDENO OHLAJEN - sicer vam poskus ne bo uspel. En dan prej alkohol postavite v zamrzovalnik. Iz zamrzovalne omare ga vzemite tik preden ga želite uporabiti. Za uporabo je primeren alkohol, ki je vsaj 70 odstotni (sedaj lahko preverite vaša razkužila za roke). V kolikor nimate etanola, lahko uporabite domače ali kupljeno žganje. Višja je koncentracija alkohola, večja je možnost, da poskus uspe. Seveda pa lahko eksperimentirate in poskusite tudi z nižjimi koncentracijami.
- V kolikor nimate ananasovega soka, lahko ta korak izpustite.
- V kolikor nimate filter papirja za kavo, lahko uporabite cedilo, prefiltrirate skozi gazo, robček, ... Pomembno je, da odstranite vse trde delce in vam ostane le tekočina. Idealno je, da uporabite ozek in visok kozarec.

3 Potek poizkusa in rezultat

Zaradi nezmožnosti pridobitve čistega alkohola sem vajo naredil z navadnim 40% viskijem. Kot po pričakovanjih ekstrakcija ni uspela, verjetno zato, ker je bil alkohol preveč razredčen. Alkohol sem pred uporabo v zamrzovalniku pustil 24 ur. To je pomemben korak, saj mora biti alkohol ledeno hladen, da bodo DNK molekule, ki bodo ob izvedbi poizkusa na sobni temperaturi, splavale na površje ali vsaj na polovico alkohola, tako da bodo vidne. Poleg tega sem imel v zmesi 1 premalo encimov, saj nisem dodal ananasovega soka. Ta dva dejavnika sta torej vplivala na neuspešnost poizkusa. Iz zmesi s celicami se namreč niso dvignili nobeni beli strdki, torej se DNK ni izluščil dovolj, da bi se ga lahko videlo s prostim očesom. Obstaja tudi možnost, da ekstrakcija ni uspela zaradi dodatkov viskiju, kot so na primer sladkorji.

4 Vprašanja in odgovori

Definiraj, kaj je ekstrakcija! Ekstrakcija ali izluževanje je kemijska metoda, ki omogoča prenos molekul zelene snovi iz trdne zmesi ali raztopine v drugo tekočo fazo s pomočjo topila. Ekstrakcija iz trdnih snovi (ekstrakcija trdno-tekoče) temelji na različni topnosti posameznih spojin v ekstrakcijskem topilu, ekstrakcija iz raztopin (ekstrakcija tekoče-tekoče) pa na različni topnosti in porazdeljevanju spojin iz zmesi v dveh topilih, ki se med seboj ne mešata (običajno voda in organsko topilo). [1]

Kakšen postopek je filtracija in kaj je to filtrat? Filtracija je postopek ločevanja tekočine in trdne snovi suspendirane v njej, pri katerem tekočina prehaja skozi medij (filter), ki je nepropusten za trdno snov. [2] Filtrat je bistra tekočina, ki jo dobimo pri filtriranju. [3]

Pri tem eksperimentu tremo neko živilo. Če bi dodali nekaj kremenčevega peska, bi lahko na koncu ugotovili, da smo izolirali več DNA kot sicer. Zakaj po tvojem mnenju dodatek kremenčevega peska poveča količino izolirane DNA? Ker bi živilo razdrobili na večjo prostornino in bi encimi hitreje in bolj reagirali.

Kaj je vloga raztopine 1 (sol, detergent, voda)? Da predre membrano celic, s tem ko razdruži maščobe.

Razloži kaj konkretno naredi detergent ob stiku z maščobami. Zapiši primer iz vsakdanjega življenja, ki dokazuje njegovo uporabo. Razdribo jih na manjše dele in raztopi. Zato se detergent uporablja pri čiščenju mastnega posodja.

Ananasov sok vsebuje veliko proteaznih encimov. Kaj je vloga teh encimov? Uničijo oziroma natančneje pretvorijo histone v deoksiribonukleinski kislini.

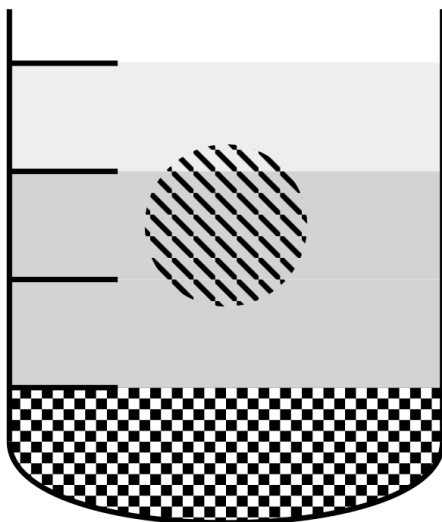
Imenuj proteine, na katere je navita DNK molekula. Kakšna je njihova vloga? Histoni. Histon je bazična beljakovina, ki se povezuje z DNK in tvori kromosom. [4]

DNK se v alkoholni fazi obori. Kaj to pomeni? Da se lahko združi v skupke in da ni več topen v alkoholu.

Ali je izolirana DNK, ki jo opazujete, čista ali vsebuje še kakšne primesi? Utemelji. Vsebuje dodatne primesi, še posebej največ alkohola, saj v njem plava.

Skiciraj epruveto, (kozarec) v kateri poteka poskus, in na skici ustrezno označi alkoholno fazo, vodno fazo oziroma filtrat ter oborjeno DNK molekulo. Spodaj je slik'ca, ki prikazuje, kako *naj bi* epruveta izgledala po koncu uspešnega poskusa.

Slika 1: Skica epruvete po reakciji



Šrafiran krog prikazuje molekule DNK, ki so zaradi toplotne razlike glede na hladni alkohol splavale v sredino alkohola. Molekule so bele barve in imajo trdno vezavo, torej jih previdno lahko brez težav dvignemo iz tekočine.

Sivi sloji prikazujejo hladni alkohol, ki smo ga dolili zmesi s celicami in se z njo ni popolnoma zmešal.

Kockast predel predstavlja zmes s celicami, iz katere ekstrahiramo DNK.

5 Viri in literatura

[1] *Ekstrakcija*. 2018. [citirano 9. aprila 2020]. Dostopno na naslovu <https://w.wiki/MRJ>

[2] *Filtracija*. 2018. [citirano 9. aprila 2020]. Dostopno na naslovu <https://w.wiki/MRK>

[3] *Filtracija*. [citirano 9. aprila 2020]. Dostopno na naslovu <https://eucbeniki.sio.si/nar7/979/index7.html>

[4] *Histon*. 2018. [citirano 9. aprila 2020]. Dostopno na naslovu <https://w.wiki/MSK>