

# T É M A : IZOLACE MOLEKULY DNA Z ROSTLINNÝCH MATERIÁLŮ

Vypracoval/a:

Třída:

Spolupracoval/a:

Datum:

## NÁPLŇ PRÁCE:

### Izolace molekuly DNA z rostlinných materiálů

## ANOTACE:

Pomocí jednoduchých separačních metod izolujete z vhodných rostlinných materiálů molekulu DNA, která patří mezi biologické makromolekuly a je nositelkou genetické informace. Z rostlinných materiálů jsou nejvhodnější paprika, rajče, kiwi, banán, cibule či vyzrálé jablko. Každá ze skupin může zvolit jiný druh ovoce či zeleniny a jednotlivé poznatky a výsledky izolace mezi sebou porovnat a diskutovat.

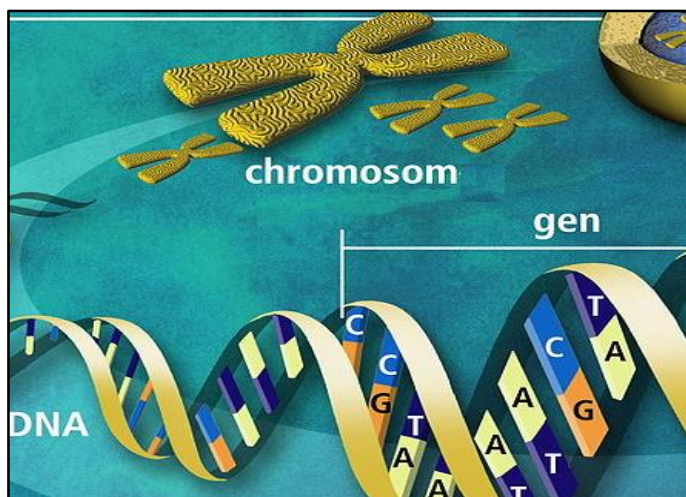
## TEORIE:

Nukleové kyseliny jsou makromolekulární látky přítomné v každé buňce. Známe dva druhy nukleových kyselin, které se od sebe liší chemickým složením, strukturou, funkcí a místem výskytu v buňce. Jedna se nazývá **deoxyribonukleová kyselina (DNA)**, druhá se označuje jako **ribonukleová kyselina (RNA)**.

V molekulách nukleových kyselin se uchovává genetická (dědičná) informace. Nukleové kyseliny zajišťují přenos genetické informace z generace na generaci a řídí její přepis do specifické struktury molekul bílkovin.

Název nukleových kyselin je odvozen z latinského názvu buněčného jádra (lat. nucleus – jádro). **Roku 1869 byla molekula DNA poprvé izolována právě z jader bílých krvinek.** Roku 1943 byla objasněna funkce molekuly DNA a roku 1963 byla popsána její trojrozměrná struktura.

Molekula DNA se nachází převážně v jádrech buněk, v malých množstvích byla zjištěna i v mitochondriích, v plastidech u rostlin a v plasmidech u bakterií. **Je stavebním materiálem chromosomů.**



Obrázek 1: Molekula DNA

Molekula DNA se skládá ze **dvou polynukleotidových řetězců pravotočivě stočených kolem společné osy** (tj. ve směru pohybu hodinových ručiček). Průměr šroubovice je cca. 2 nm. Řetězce mají navzájem opačný směr.

Předpokládá se, že každý chromozom eukaryotní buňky obsahuje jednu molekulu DNA. Délka molekuly a informační obsah je obrovský. Celková délka DNA ve 23 haploidních chromozomech člověka je 0,99m.

## PRINCIP IZOLACE:

Abychom uvolnili molekuly DNA, musíme provést pět základních laboratorních operací – **homogenizaci** vzorku, **lýzu** buněčných stěn a membrán, **centrifugaci** uvolněného homogenního materiálu (můžeme vynechat, pokud se spokojíme s menším výtěžkem a kvalitou DNA), **filtraci** vodného roztoku DNA a **vysrážení** vláken molekul DNA z vodného roztoku.

Každý z pěti uvedených kroků je podrobně popsán na straně 2 až 3 v pracovním postupu

## PŘÍPRAVA:

1. Přineste si s sebou jednu z následujících pomůcek: půlku cibule, malé rajče, banán, kiwi, zralé jablko, papriku
2. Zopakujte si kapitulu makromolekulární látky – nukleové kyseliny a jejich chemické složení

## ÚKOL Č. 1:

1. Z vybraného druhu ovoce či zeleniny izolujte podle pracovního postupu molekuly DNA
2. Pokuste se jedno z izolovaných vláken namotat na tyčinku a pozorujte ho pod mikroskopem
3. Porovnejte vzhled a kvalitu izolovaných vláken DNA z jednotlivých druhů vzorků

### POMŮCKY:

2 kádinky 100 ml, trojnožka, nádoba s vodní lázní, teploměr, síťka, třecí miska, nožík, stojan, kruhový držák, filtrační nálevka, uhelón nebo gáza, skleněná tyčinka, odměrný válec 20 ml

### MATERIÁL A CHEMIKÁLIE:

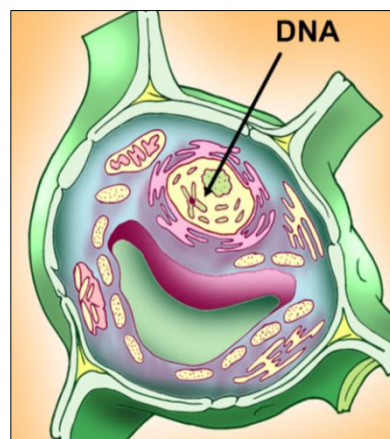
Cibule, rajče, paprika, banán, kiwi, jablko, chlorid sodný 5% roztok, 3% roztok EDTA, dodecylsírán sodný 10% roztok, HS-pufr, propan-2-ol, destilovaná voda

## POSTUP:

### HOMOGENIZACE VZORKU

Homogenizací se snažíme co nejvíce a co nejúčinněji rozrušit buněčné pletiva a buněčné stěny materiálu, z něhož DNA izolujeme. Pokud izolujeme DNA z listů či mechů, použijeme při homogenizaci kapalný dusík. Homogenizace se provádí nejčastěji mechanicky v třecí misce pomocí tloučku.

1. Vzorek zeleniny o hmotnosti přibližně 5 g nakrájíme na malé kousky laboratorním nožkem.
2. Nakrájený vzorek převedeme do větší třecí misky a pomocí tloučku jej třeme (homogenizujeme) za vzniku kašovité hmoty.



Obrázek 2: Rostlinná buňka

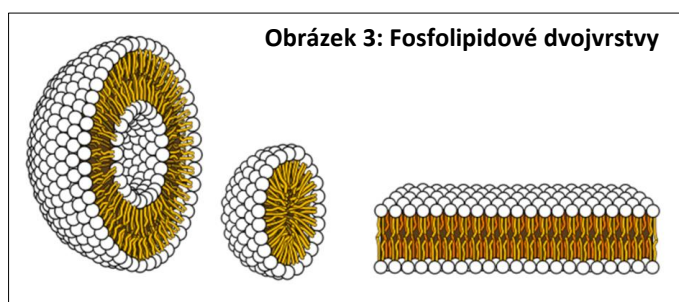
### ROZKLAD FOSFOLIPIDOVÝCH BIOMEMBRÁN

Ve druhém kroku musíme rozložit fosfolipidové dvojvrstvy a uvolnit tak DNA z jednotlivých organel do roztoku. Vhodnou a dostupnou chemikálií je dodecylsírán sodný, který je mimo jiné obsažen ve většině běžně prodávaných detergentů.

Dodecylsírán sodný kromě rozrušování buněčných membrán také denaturuje buněčné proteiny, na které se váže. Denaturaci proteinů podporuje také kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA). Po přidavku vyšší koncentrace draselných iontů se dodecylsírán sodný a EDTA sráží společně s vázanými denaturovanými proteiny za vzniku sraženiny.



3. Obsah třecí misky převedeme laboratorní lžičkou do kádinky na 100 ml
4. Odměrným válečkem přidáme 15 ml 5% roztoku NaCl a 10 ml 3% roztoku EDTA (chelaton 2)
5. Dále přidáme odměrným válečkem 5 ml 10% dodecylsírán sodného a pomalu promícháme (aby směs nepěnila)
6. Směs zahřejeme na 65°C s výdrží 10 minut za občasných promíchání
7. Za tepla přidáme 10 ml HS-pufu (30 g octanu draselného, 12 ml kyseliny octové, 80 ml vody)
8. Po promíchání směs ochladíme (nejlépe v kádince s ledovou tříští)

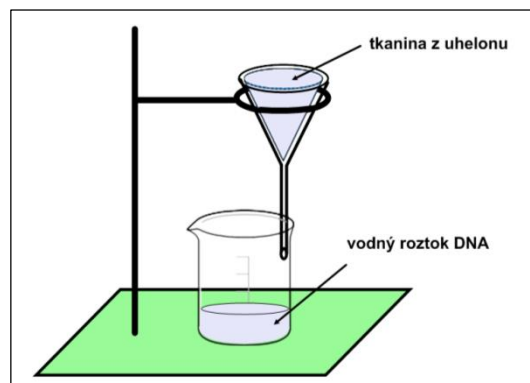


## CENTRIFUGACE A FILTRACE

Cílem těchto separačních metod je oddělit vodný roztok DNA od vysrážených proteinů a solí, zbytků rostlinných pletiv a buněčných stěn. Ideální je kombinace obou postupů, přičemž odstředování předchází filtraci. Pokud nemáme možnost použít centrifugu, musíme se spokojit s menším výtěžkem a menší kvalitou DNA.

Filtraci materiálu provedeme přes uhelon, což je tkanina z polyamidových vláken, kterou běžně používají včelaři. Tento materiál zachycuje pevné organické rostlinné zbytky s vysráženými solemi, zatímco vodný roztok DNA propouští.

9. Sestavíme jednoduchou filtrační aparaturu, v níž místo filtračního papíru použijeme tkaninu z uhelonu nebo vícevrstvou gázu
10. Ochlazený materiál přefiltrujeme do čisté kádinky na 100 ml



Obrázek 4: Filtrace roztoku DNA přes uhelon

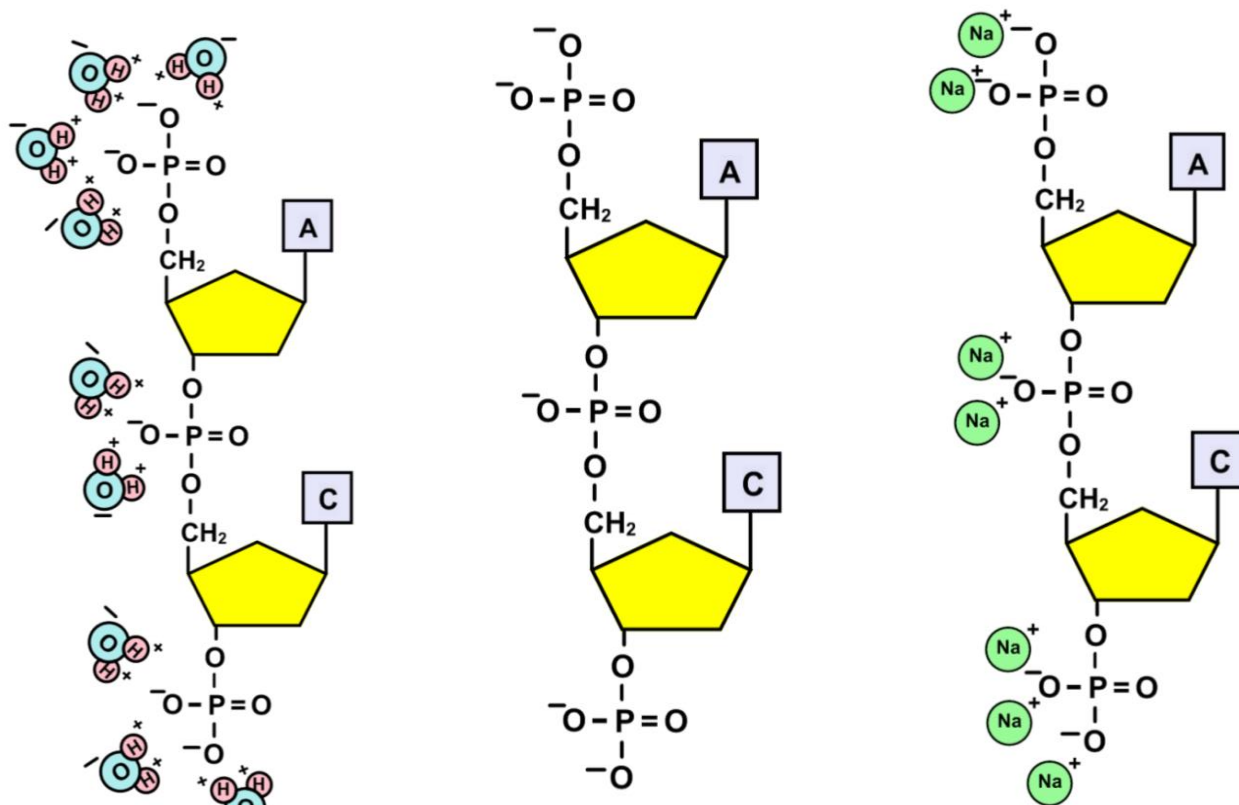
## SRÁŽENÍ DNA

Molekula DNA je rozpustná v silně polárních rozpouštědlech (např. voda), jelikož obsahuje polární, ve vodě zcela disociované hydroxyskupiny fosfátových zbytků, které tvoří společně s deoxyribosami páteř celé molekuly. Fosfátové skupiny se vyznačují záporným nábojem a jsou hydratované.

Pokud snížíme polaritu rozpouštědla přidávkou méně polárních látek (ethanol, propan-2-ol), oslabíme hydrataci iontů vzniklých na fosfátových skupinách. Páteř šroubovice tak získá záporný náboj, který je třeba vyvážit přidávkou iontů kladných. Jako kladné ionty v této chvíli působí ionty  $\text{Na}^+$ , které byly ke vzorku přidány ve formě roztoku NaCl v bodě č. 4.

Molekula DNA zbavená hydratovaných skupin a zbavená záporného náboje vypadává z roztoku (sráží se).

11. Filtrát v kádince opatrně převrstvíme 20 ml ledového propan-2-olu
12. Pomalým mícháním skleněnou tyčinkou obě fáze opatrně propojíme
13. Po 5 minutách by se měly objevit vysrážené molekuly DNA
14. Špejlí se pokusíme některé z vláken zachytit, namotat a přenést na podložní sklíčko mikroskopu



Obrázek 5: Změny náboje molekuly DNA během srážení



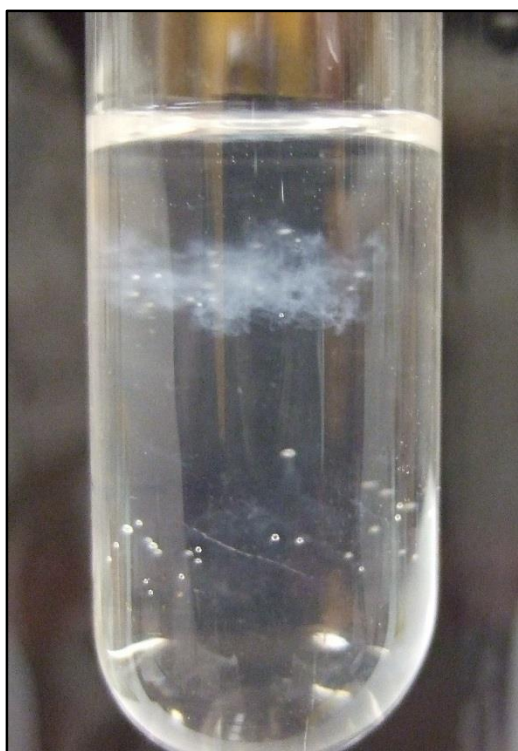
## FOTODOKUMENTACE:



Obrázek 6: Homogenizovaný vzorek



Obrázek 7: Filtrace vodného roztoku DNA



Obrázek 8: První viditelná vlákna DNA

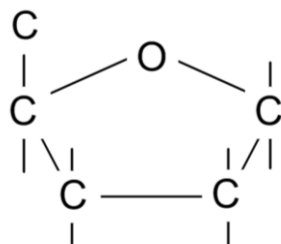


Obrázek 9: Vysrážěná DNA

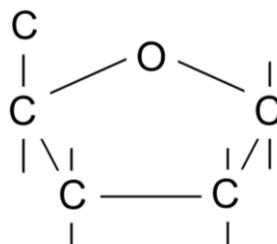
## ZÁVĚR:

## SHRNUTÍ:

- Na obrázcích 10a a 10b jsou neúplné vzorce monosacharidů, které tvoří společně s fosfáty tzv. páteř molekuly DNA. Vytvořte z obrázku 10a **vzorec  $\beta$ -D-2-deoxyribosy** a z obrázku 10b vzorec  **$\beta$ -D-ribosy**. Současně na obrázcích očísľujte jednotlivé uhlíky.



Obrázek 10a: Skelet  $\beta$ -D-2-deoxyribosy



Obrázek 10b: Skelet  $\beta$ -D-ribosy

- Do rámečku označeného písmenem A napište **vzorec purinu** a do řádků pod rámečkem vepište názvy nukleových bází, které jsou od purinu odvozeny. Do rámečku označeného písmenem B napište **vzorec pirimidinu** a do řádků pod rámečkem vepište názvy nukleových bází, které jsou od pirimidinu odvozeny a jsou obsaženy v DNA.

**A**
**purin**

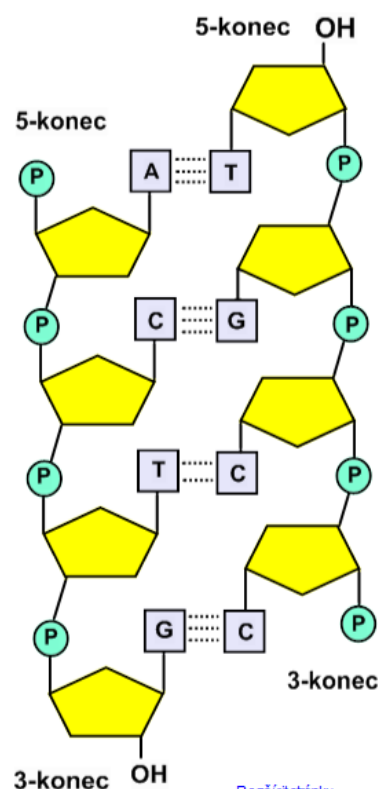
.....  
.....

**B**
**pyrimidin**

.....  
.....

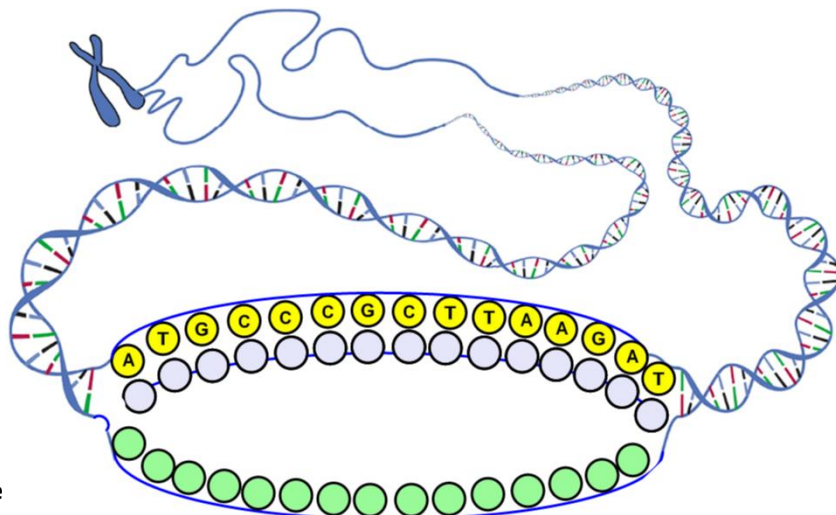
- Na obrázku č. 11 je pomocí zjednodušeného zápisu uveden vzorec krátkého úseku dvouvláknové DNA.

**Obrázek obsahuje 5 chyb, které máte za úkol najít a červeně zakroužkovat.**



Obrázek 11: Chybný zápis molekuly DNA

4. Na obrázku č. 12 je znázorněna jedna z fází proteosyntézy – transkripce. Podle žlutého kodogenního vlákna DNA se syntetizuje mRNA, která je na obrázku znázorněna modrou barvou. Kódující vlákno DNA je znázorněno zeleně. Doplňte zkratky jednotlivých nukleových bází jak do vlákna mRNA, tak do kódujícího vlákna DNA.



Obrázek 12: Transkripce

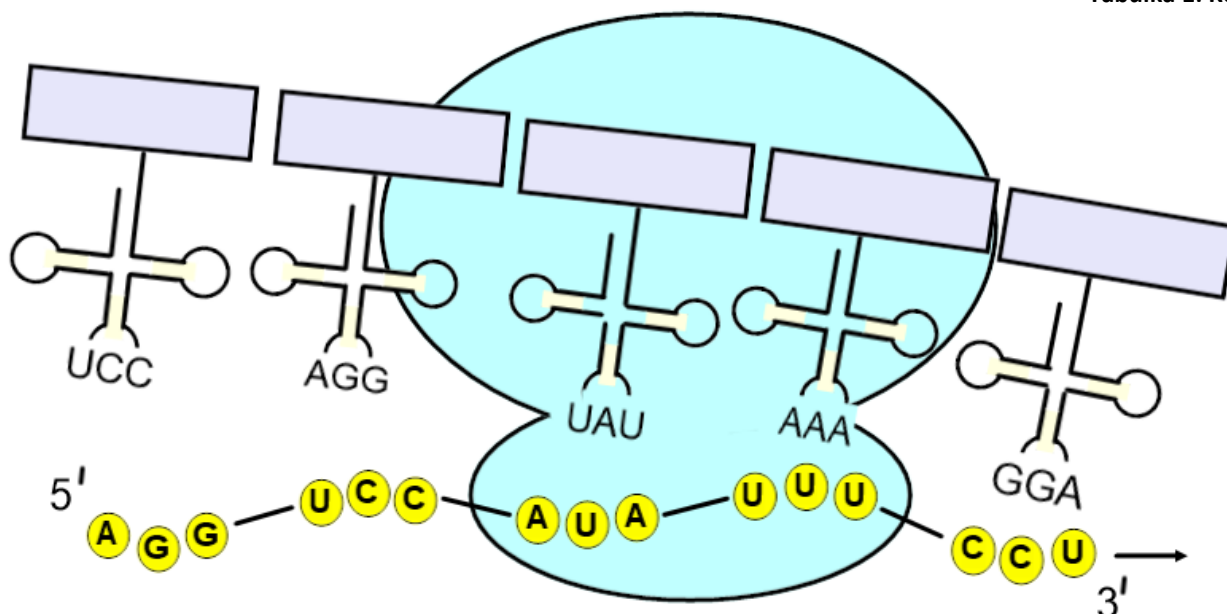
5. Na obrázku č. 13 je znázorněna jedna z fází proteosyntézy – translace. S pomocí tabulky kodonů doplňte do prázdných rámečků názvy aminokyselin, které jsou pomocí molekul tRNA přinášeny k ribozomu.

tabulka kodonů (pro mRNA, čteno od 5-konce)

	U	C	A	G	
U	phenylalanin	serin	tyrosin	cystein	U C
	leucin		stop	stop tryptophan	A G
C	leucin	prolin	histidin	arginin	U C
			glutamin		A G
A	isoleucin	threonin	asparagin	serin	U C
	methionin (start)		lysín	arginin	A G
G	valin	alanin	k. asparagová	glycin	U C
			k. glutamová		A G

Obrázek 13: Translace

Tabulka 1: Kodony



## SEZNAM ZDROJŮ:

- [01] *Wikimedia Commons: Úložiště volně využitelných souborů: DNA molekula života - česky.jpg* c2010 [citováno 10.07. 2013] Obr. 01 dostupný z <[http://commons.wikimedia.org/wiki/File:DNA\\_molekula\\_%C5%BEivota\\_-\\_%C4%8Desky.jpg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:DNA_molekula_%C5%BEivota_-_%C4%8Desky.jpg)>
- [02] *Wikimedia Commons: Úložiště volně využitelných souborů: File:Phospholipide in File:Phospholipide in Wasser.svg* c2011 [citováno 15.07. 2013] Obr. 03 dostupný z [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Phospholipide\\_in\\_Wasser.svg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Phospholipide_in_Wasser.svg)
- [03] Obrázek 3. Z archivu autora
- [04] Obrázek 4. Z archivu autora
- [05] Obrázek 5. Z archivu autora
- [06] Obrázek 6. Z archivu autora
- [07] Obrázek 7. Z archivu autora
- [08] Obrázek 8. Z archivu autora
- [09] Obrázek 9. Z archivu autora
- [10] Obrázek 10. Z archivu autora
- [11] Obrázek 11. Z archivu autora
- [12] Obrázek 12. Z archivu autora
- [13] Obrázek 13. Z archivu autora

## METODICKÝ LIST:

<b>Název školy</b>	Gymnázium a Jazyková škola Zlín s právem státní jazykové zkoušky Zlín
<b>Autor</b>	Ing. Pavel Horčic
<b>Vzdělávací oblast</b>	Člověk a příroda
<b>Vzdělávací obor</b>	Chemie
<b>Tematický okruh</b>	Nukleové kyseliny – izolace molekul DNA
<b>Druh učebního materiálu</b>	Laboratorní cvičení – žák
<b>Cílová skupina</b>	Žák, 17 – 18 let
<b>Anotace</b>	Pracovní list je určen do výuky laboratorních cvičení z chemie náplň: deoxyribonukleová kyselina, její chemické složení, nukleotidy