

ZÁKLADNÍ ŠKOLA NOVÁ PAKA, HUSITSKÁ 1695
absolventská práce



Izolace DNA

Martin Šébl

Vedoucí absolventské práce: Mgr. Lukáš Rambousek

Předmět: Chemie

Školní rok: 2014 - 2015

Prohlašuji, že jsem absolventskou práci vypracoval samostatně s použitím uvedené literatury a materiálů. Všechny použité zdroje jsem citoval.

Souhlasím s tím, aby má absolventská práce byla k dispozici zájemcům o její studium.

V Nové Pace 10. 6. 2015

Obsah

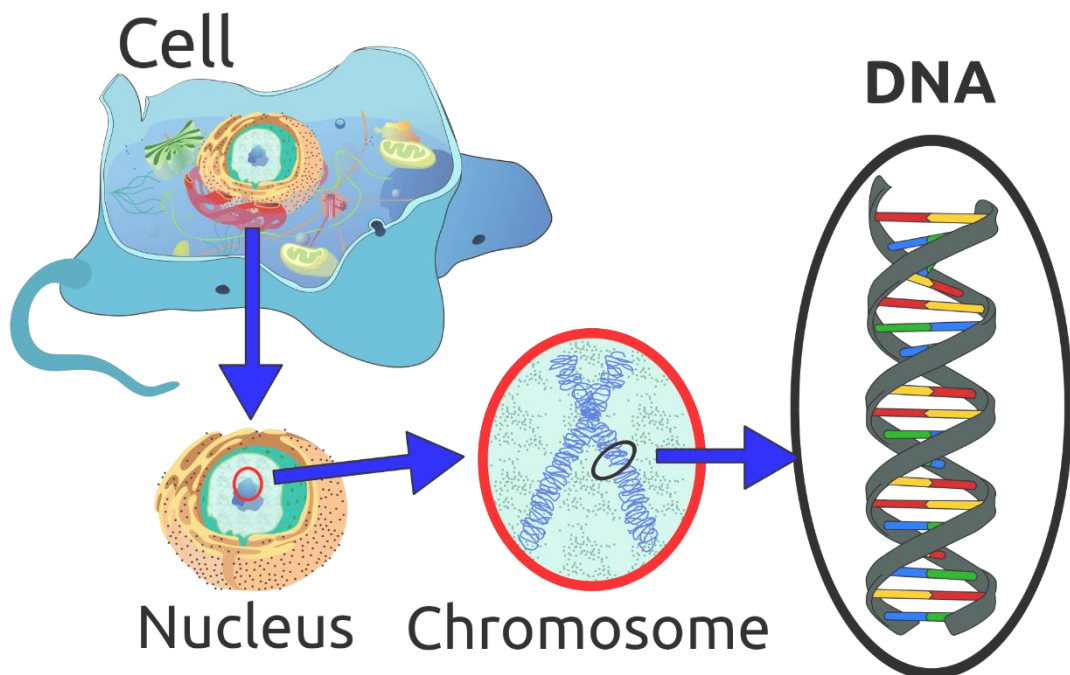
1. Úvod.....	4
2. Charakteristika DNA.....	4
3. Ingredience	5
4. Postup.....	7
4.1. Mechanické rozrušení buněčných stěn.....	7
4.2. Příprava extrakčního činidla	12
4.3. Smíchání	12
4.4. Filtrace.....	15
4.5. Vysrážení	18
5. Vlastnosti jednotlivých vzorků.....	20
6. Závěr	28
7. Zdroje.....	28

1. Úvod

Chemie patří mezi mé nejoblíbenější předměty, proto jsem si zvolil jako téma mé absolventské práce izolaci DNA. Mým hlavním úkolem bylo izolovat DNA z rostlinných produktů ve formě sraženiny metodou proděravění buněčných membrán. Na závěr jsem porovnával jejich vlastnosti.

2. Charakteristika DNA

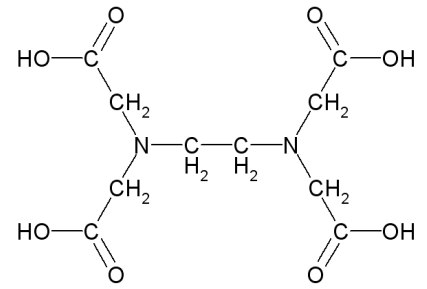
DNA (Deoxyribonukleová kyselina) je nukleová kyselina, nositelka genetické informace všech organismů s výjimkou některých nebuněčných, u nichž hraje tuto úlohu RNA. Ve své struktuře kóduje a buňkám zadává jejich program a tím předurčuje vývoj a vlastnosti celého organismu. Dvě vlákna DNA se často spojují a vytvářejí dvoušroubovici. DNA je zásadním nástrojem pro diagnostiku nemocí, testy otcovství, vyšetřování zločinců, přípravu plodin s novými vlastnostmi či třeba hledání příbuzenských vztahů mezi organismy.



obr. 1 Umístění DNA v buňce
(Buňka-jádro-chromozom-dvoušroubovice DNA)

3. Ingredience

Ke své práci jsem použil banán, kiwi, jablko, rajče, papriku a mletou skořici. Dále jsem potřeboval šampon obsahující EDTA (ethylendiamintetraacetát), chlorid sodný (NaCl), destilovanou vodu, podchlazený líh a živočišné uhlí.



obr. 2 Vzorec EDTA



obr. 3 Suroviny k izolaci DNA



obr. 4 Živočišné uhlí k odbarvení papriky



obr. 5 Připravené chemikálie

4. Postup

4.1. Mechanické rozrušení buněčných stěn

Nejprve bylo potřeba rozmělnit jednotlivé vzorky na kašovitou hmotu v třecí misce. Začal jsem banánem a skončil paprikou, přičemž jsem všechno krájel na malé kostičky. Ačkoliv se zdá banán měkký a lehce zpracovatelný, v třecí misce klouzal a tudíž s ním bylo dost práce. Asi nejlepší na zpracování bylo jablko, které jsem předtím samozřejmě oloupal.



obr. 6 Příprava banánu



obr. 7 Příprava kiwi



obr. 8 Kiwi kaše



obr. 9 Příprava jablka



obr. 10 Kousky jablka



obr. 11 Zátěší s rajčetem



obr. 12 Rozkrojená paprika



obr. 13 Paprika v třecí misce

4.2. Příprava extrakčního činidla

Pro každý jednotlivý vzorek jsem zvlášť připravoval extrakční roztok, který se skládal z 30ml destilované vody, 0,1g NaCl a 7ml šamponu.



obr. 14 Odměrný válec se šamponem vlevo a vodou vpravo

obr. 15 Kádinka s extrakčním roztokem

4.3. Smíchání

Do čisté kádinky jsem slil kašovitou hmotu s činidlem a opatrně zamíchal, aby se roztok příliš nezpěnil, poté jsem ho nechal asi 10 minut odstát. Uvolnění DNA z buněk se provádí pomocí detergentů obsažených v šamponu, které proděraví a vysráží buněčnou membránu a také některé proteiny. Sůl se přidává pro udržení iontové síly roztoku, nezbytné pro setrvání DNA ve formě dvoušroubovice. Voda je reakčním prostředím a mimo jiné látkou, ve které je DNA rozpustná. Není rozpustná jako třeba sůl, ale ve vodném roztoku je schopná projít filtrem.



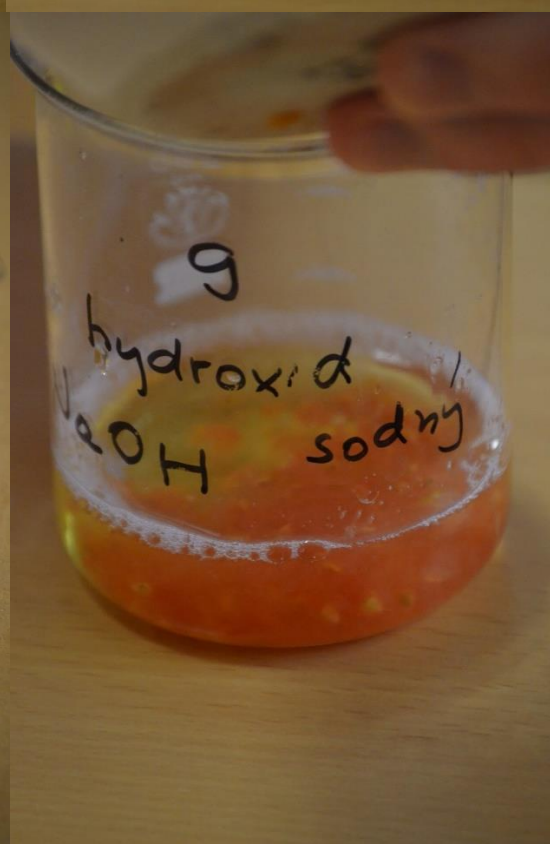
obr. 16 Roztok banánu



obr. 17 Roztok kiwi



obr. 18 Roztok jablka



obr. 19 Roztok rajčete



obr. 20 Roztok papriky



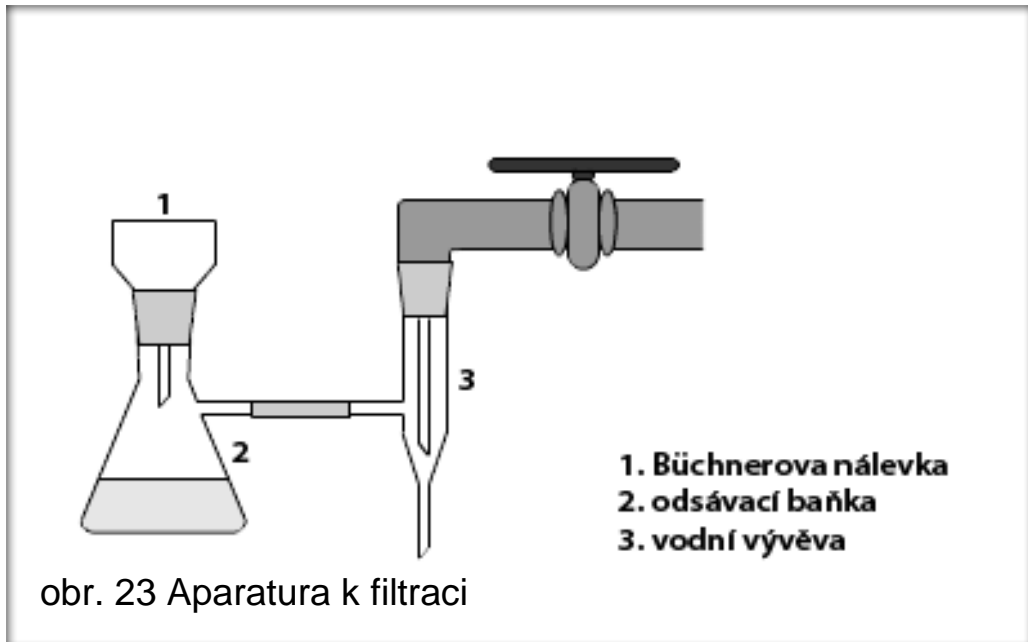
obr. 21 Roztok skořice

4.4. Filtrace

Použil jsem metodu filtrace za sníženého tlaku (viz obrázek 23). Filtrací se odstraní všechny látky, které jsou nerozpustné ve vodě. Do filtrátu projde kromě DNA i řada dalších látek z původní buňky, ale i sůl a některé složky šamponu. Filtrace trvala nejdéle u banánu, naopak tomu bylo u ostatních roztoků. Paprikový filtrát jsem rozdělil na dvě části a do jedné jsem přimíchal rozdrčené živočišné uhlí a další filtrací se ho pokusil odbarvit.



obr. 22 Rostoky připravené k filtraci



obr. 24 Filtrace
banánového roztoku



obr. 25 Filtrace
paprikového roztoku



obr. 26 Křišťálově čistá radost



obr. 27 Odbarvení papriky

4.5. Vysrážení

Filtráty jednotlivých vzorků jsem nalil do zkumavek (asi do výše 1cm). Podchlazený líh se přilévá, protože se za nižší teploty příliš nemísí s vodou. DNA se vysráží a vyplave do horní části. V lihu je nerozpustná, ovšem pokud se líh začne ohřívat, sloučí se s vodou a DNA se znovu rozpustí.



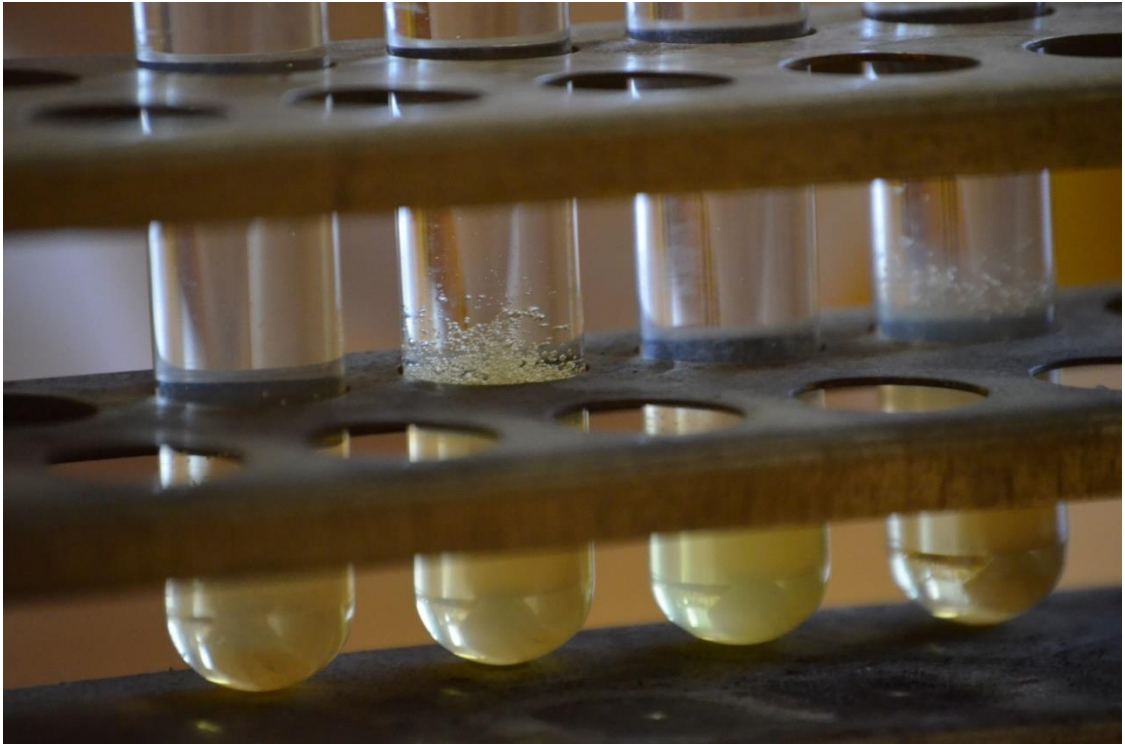
obr. 28 Rostoky a jejich filtráty



obr. 29 Podchlazený líh



obr. 30 Přilévání podchlazeného lihu do zkumavek s filtráty



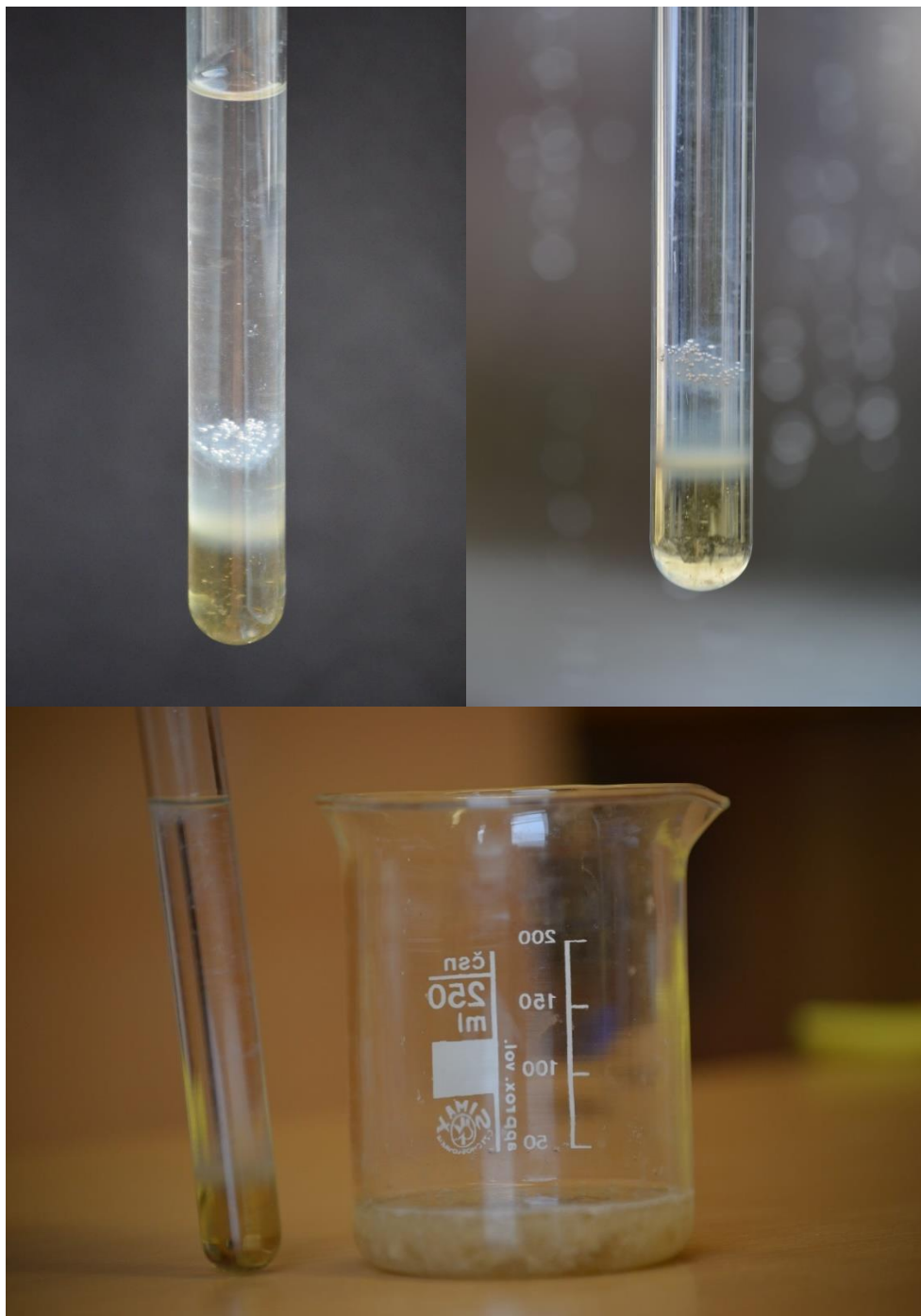
5. Vlastnosti jednotlivých vzorků

Hlavní vlastnosti, které jsem pozoroval, byly barva, rychlost stoupání a kvalita. Namotání sraženiny na špejli se bohužel nezdařilo, protože od nalití lihu do zkumavky uběhlo cca 15 minut, a proto se sraženina začínala rozpouštět.



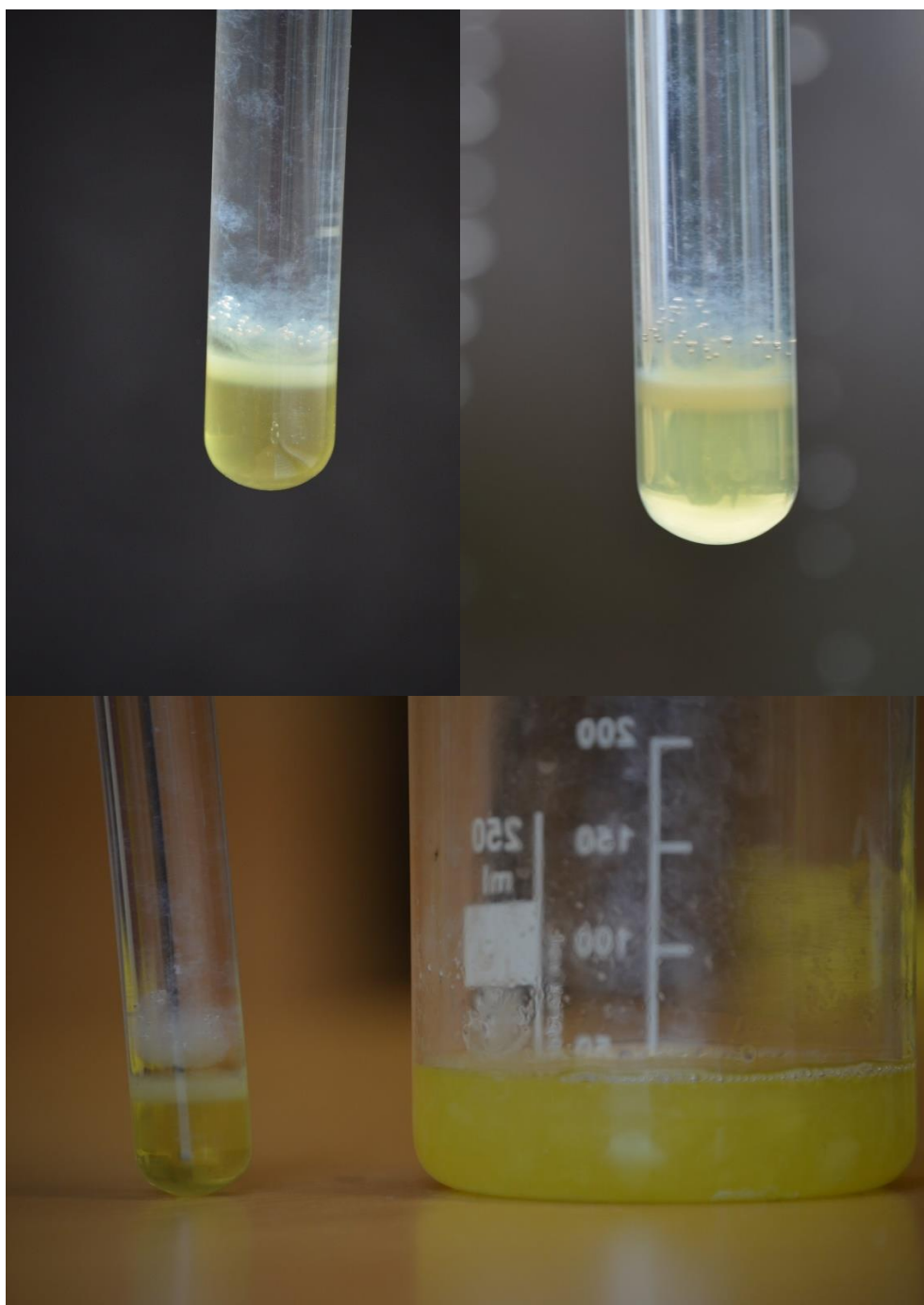
obr. 31 Izolovaná DNA ve formě sraženin

U banánu se vytvořil na přechodu mezi filtrátem a lihem zajímavý bílý pásek, který byl výraznější snad jen u kiwi, ale u ostatních vzorků nevznikl. Sraženina byla trošičku namodralá.



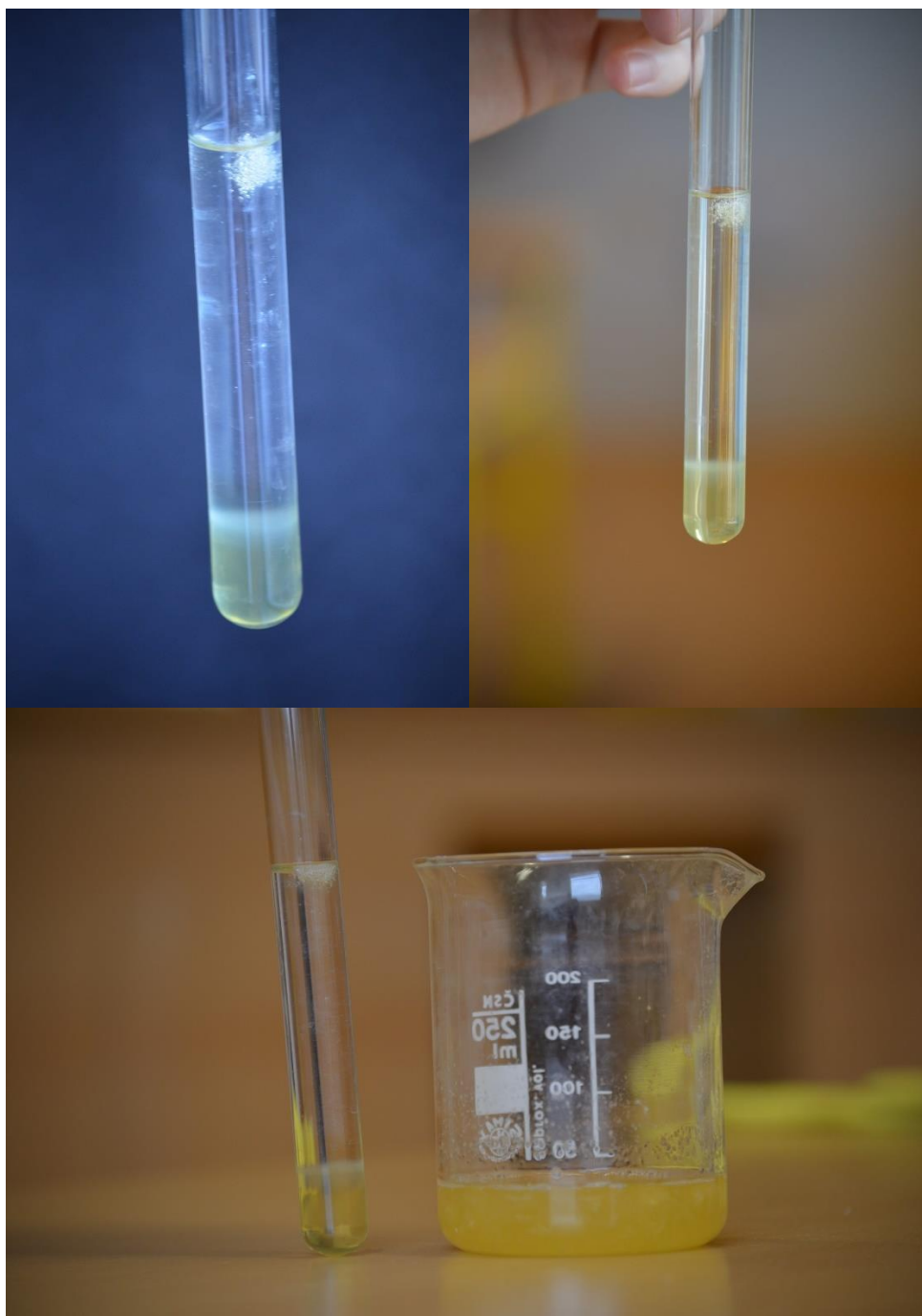
obr. 32 Sraženina DNA banánu a porovnání s jeho roztokem

Sraženina kiwi se po celou dobu držela ve spodní části. Ke kiwi se také váže výrazný bílý pásek v dolní části.



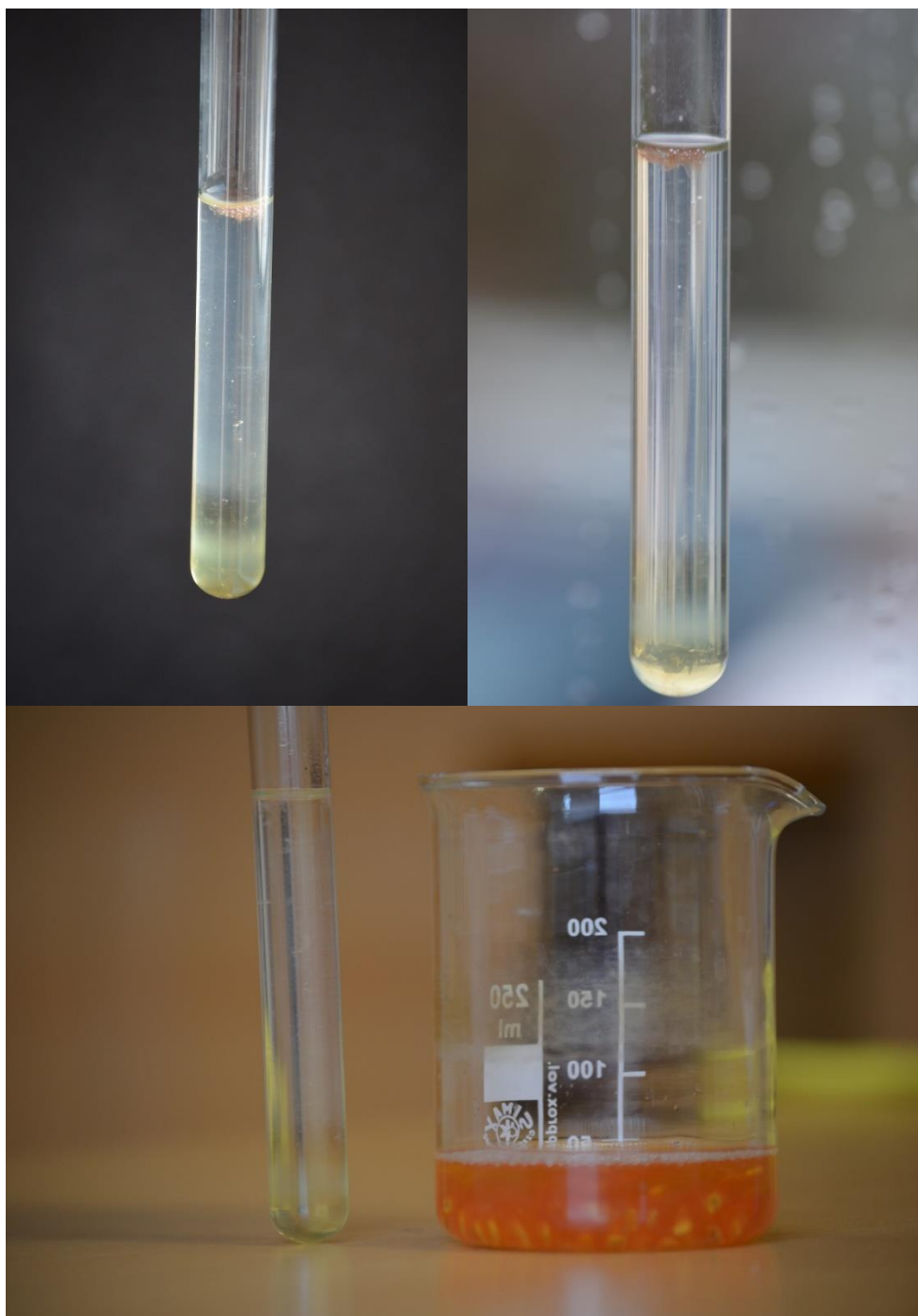
obr. 33 Sraženina DNA kiwi a porovnání s jeho roztokem

Jablko vytvořilo malý, ale poměrně hustý chuchvalec sraženiny, který také rychle vystoupal na hladinu.



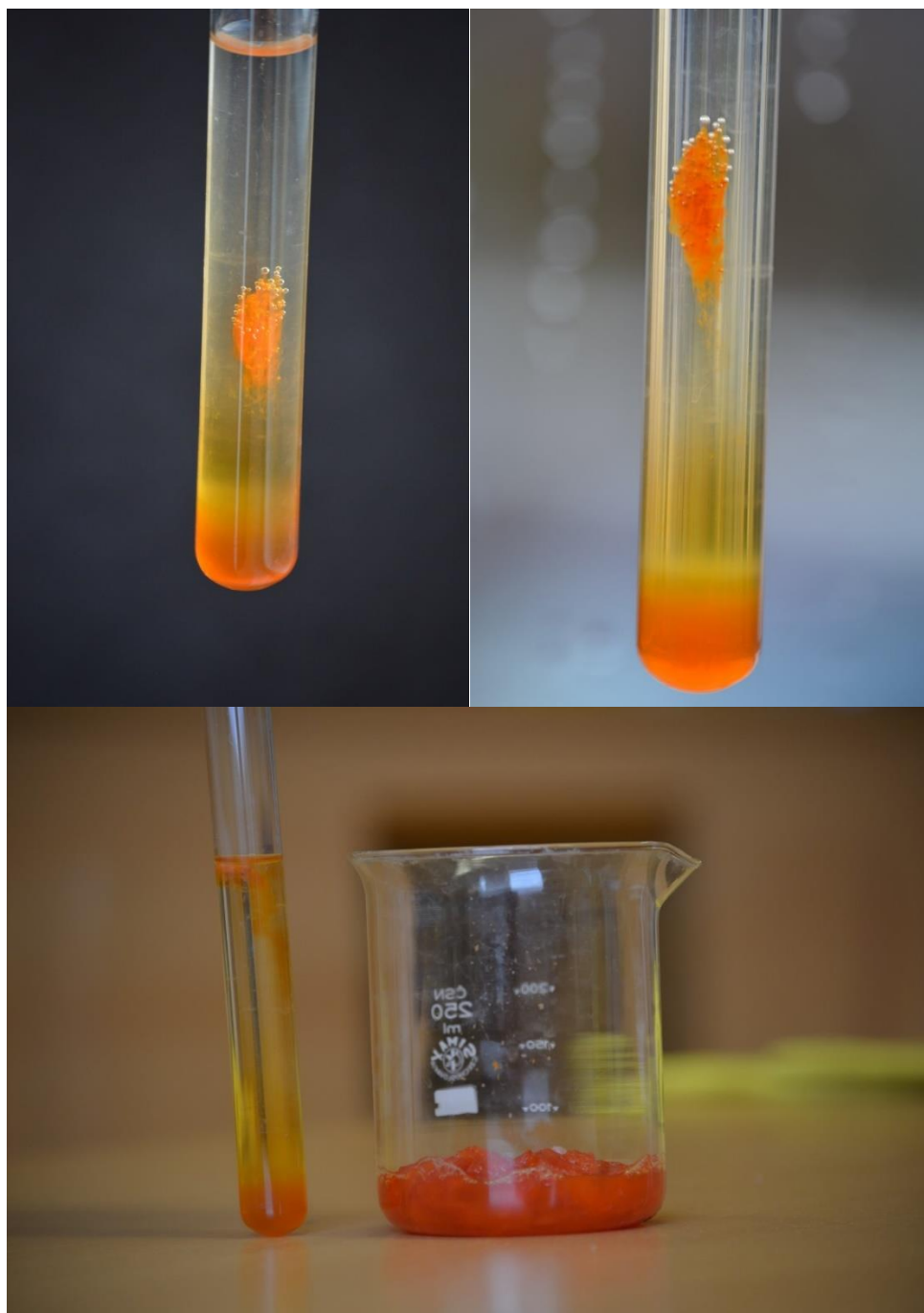
obr. 34 Sraženina DNA jablka a porovnání s jeho roztokem

Sraženina rajčete byla nevýrazná, malá a lehce načervenalá. K hladině lihu vyplavala nejrychleji.



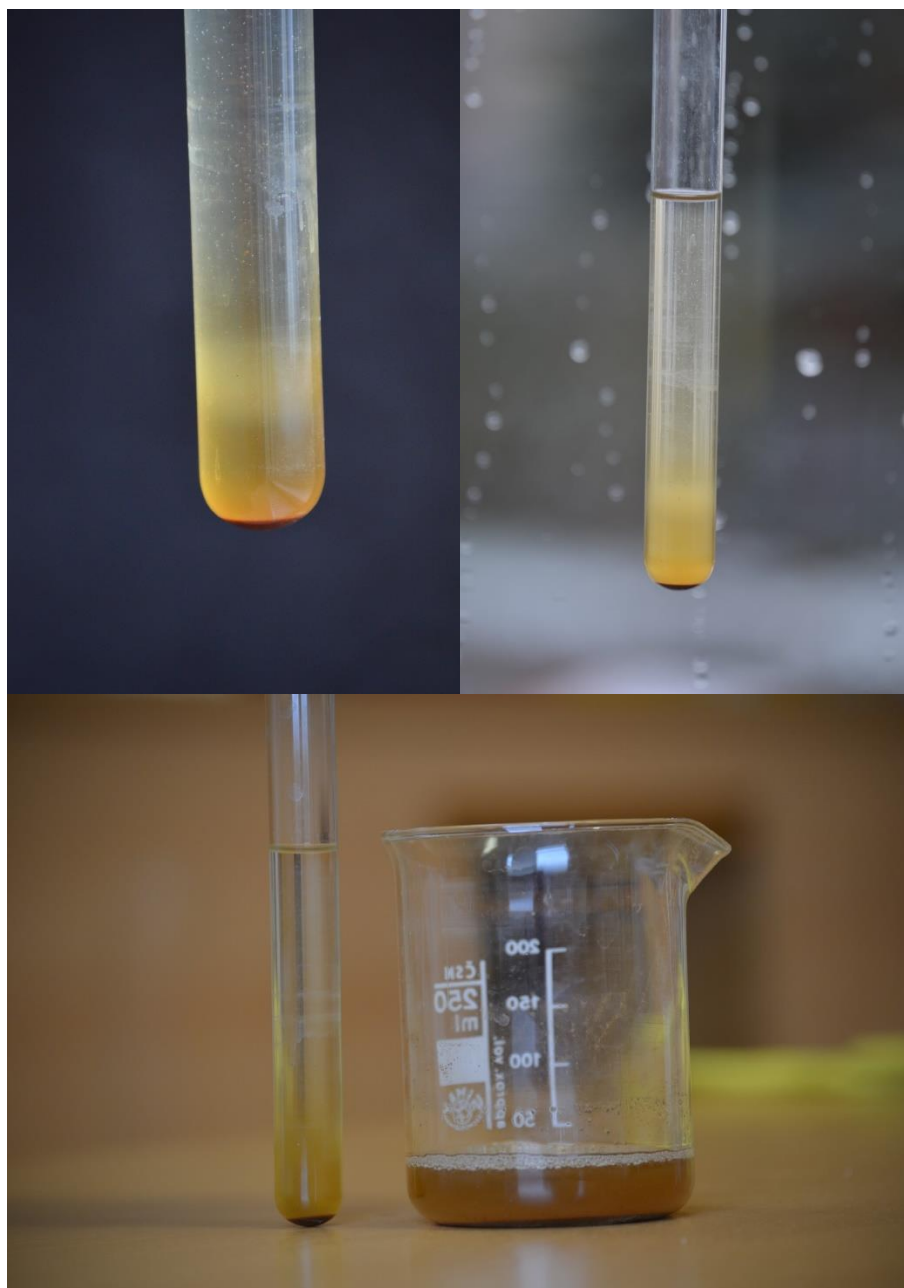
obr. 35 Sraženina DNA rajčete a porovnání s jeho roztokem

Díky velkému množství červeného barviva obsaženého v paprice byla i její sraženina výrazně zbarvena do oranžova. Ze všech byla nejzajímavější, protože svým tvarem připomínala sépii.



obr. 36 Sraženina DNA papriky a porovnání s jejím roztokem

Sraženina skořice byla oproti ostatním rozptýlená, a proto také méně výrazná.

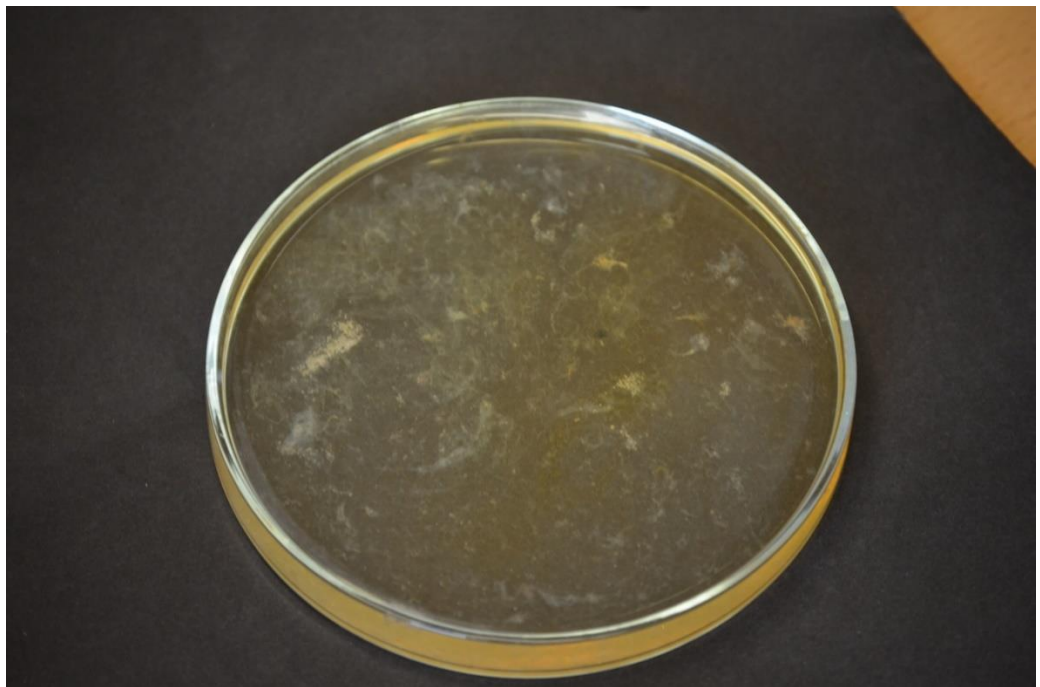


obr. 37 Sraženina DNA skořice a porovnání s jejím roztokem

Odbarvená paprika bohužel sraženinu nevytvořila.

6. Závěr

Cílem mé absolventské práce bylo izolovat DNA z výše uvedených druhů ovoce a zeleniny, což se mi povedlo. Jsem rád, že jsem si vybral toto téma pro svoji práci, protože mě bavila a také jsem se dozvěděl spoustu nových a zajímavých poznatků v oblasti DNA. Na závěr bych také rád poděkoval svému vedoucímu panu učiteli Lukáši Rambouskovi a Veronice Suchardové, které vděčím za skvělé fotografie.



obr. 38 Směs vzniklých sraženin v Petriho misce

7. Zdroje

<http://cs.wikipedia.org/wiki/DNA>

Obrázek č. 1 „Umístění DNA v buňce...“ - <http://1url.cz/M5BZ>

Obrázek č. 2 „Vzorec EDTA“ - <http://1url.cz/M5BU>

Obrázek č. 23 „Filtrace za sníženého tlaku“ - <http://1url.cz/P5NV>

Fotografie vlastní- pořízené spolužačkou Veronikou Suchardovou.