

## 4. laboratorijska vaja

# IZOLACIJA DNA IZ PARADIŽNIKA

# UVOD

DNK (DeoksiriboNukleinska Kislina) ali DNA skupaj z molekulo RNK ali RNA spada med nukleinske ali jedrne kisline, ki jih je v celični citoplazmi 3,4%. Molekulo DNK imenujemo tudi dvojna vijačnica ali dvojni heliks – takšni imeni sta nastali zaradi sestave molekule – sestavljena je namreč iz dveh komplementarnih verig, ki sta med sabo povezani z vodikovimi vezmi, in sta zaviti. Vzrok za njeno slednjo lastnost je ta, da zvita zasede manj prostora v celici. Med prepisom se odvijte, nato pa se zopet zvije nazaj. Pri tem včasih pride tudi do mutacij.

DNK je dolga molekula in je v jedru celice. Njena glavna naloga je prenos dednega zapisa v hčerinske celice, vodi pa tudi vse biokemijske procese v celici.

DNK je nerazvejan polimer. Njena osnovna enota je nukleotid. Ta je sestavljen iz dušikove baze (adenin, citozin, gvanin, timin), sladkorja (deoksiriboza) in fosfatne skupine. Štirje različni nukleotidi, ki se razlikujejo po bazi, ki je prisotna, tvorijo »genetsko abecedo« življenja na Zemlji, pri tem pa zaporedje nukleotidov, podobno kot zaporedje črk v besedi, določa pomen genetske informacije.

DNK se v vseh živih organizmih nahaja v obliki dvojne vijačnice (dvojni heliks). Pri tem se dve molekuli DNK ovijeta ena okrog druge in dušikove baze, ki se nahajajo znotraj vijačnice, se medsebojno pari. Adenin se zmeraj pari s timinom, citozin pa vedno z gvaninom (Watson – Crickovo pravilo parov).

Molekulo DNK sta po 2. svetovni vojni, natančneje leta 1953, odkrila Watson in Crick.

# CILJI

- Izolacija in opazovanje DNK
- Osvojiti osnovni princip izolacije DNK iz tkiv

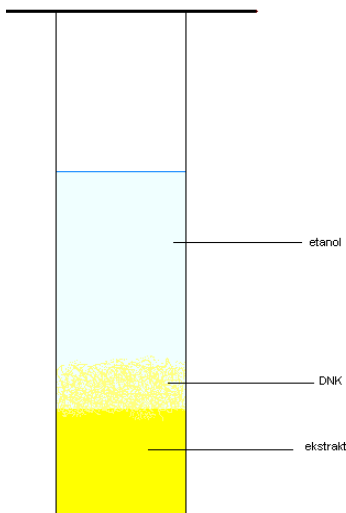
# MATERIAL

- paradižnik (ali: nektarina, banana, čebula, kivi)
- kuhinjska sol
- voda,
- etanol (94-95%)
- tekoči detergent za pomivanje posode
- leseni zobotrebec
- palični mešalnik
- menzura
- čaša
- steklena palčka
- epruveta
- stojalo za epruvete
- filtrirni papir
- stekleni lij
- skalpel ali kuhinjski nož
- deska za rezanje

## POSTOPEK

- 3g kuhinjske soli in 10 ml detergenta damo v stekleno čašo in dopolni vsebino z vodo do volumna 100ml ter z mešanjem raztopimo sol.
- Paradižnik (1/2) narežemo na koščke velikosti približno 1x1 cm (lahko tudi manjše) in dodamo v pripravljeno raztopino soli in detergenta. Detergent bo deloval tudi kot emulgator ali tenzid. Po zaslugi njegove kemične strukture izločijo lipide iz membran v raztopino in s tem uničijo celične membrane in jedrne membrane. Zato se lahko DNK sprosti (izstopi) iz celičnih jeder. Sol okrepi ta efekt. Sol prepreči agregiranje proteinov in raztopini naredi podobno fiziološki raztopini.
- Koščke paradižnika v **5** sekundah razbijemo s paličnim mešalnikom v manjše koščke - celice. Palični mešalnik pomaga pri poškodovanju celic, kjer pa velja **previdnost**, saj s tem lahko strgamo tudi verige DNK (na manjše koščke), zato miksamo lahko največ 5 sekund.
- Suspenzijo celic filtriramo skozi filtrirni papir in odmerimo 20 ml pridobljenega ekstrakta. Celične fragmente, membrane in stene bomo na ta način ločili od DNK in proteinov, ki so v raztopini.
- 20 ml hladnega etanola previdno zlijemo **posteni nagnjene epruvete** na ekstrakt. DNK ni topna v etanolu, zato se obori, odvisna je tudi od temperature - zato je etanol ohlajen.
- V zgornjo plast mešanice izločeno DNK s previdnim vrtenjem navijemo na zobotrebec in izvlečemo iz raztopine.

## REZULTATI



Po končanem poskusu se je DNK izločila in dvignila nad ekstrakt, kjer je lebdela na sredini mešanice - med etanolom in ekstraktom. Ko smo merilni valj pogledali od bližje, smo videli, da je DNK v obliki nitk oziroma vijačnic, zato smo jo tudi lahko navili na paličko.

# RAZPRAVA

V tem postopku izolirana, in na paličko navita DNK, ima še primesi kopij RNK in proteinov. Za nadaljnje zahtevnejše laboratorijske analize in raziskave tako izolirane DNK so potrebni še nadaljnji postopki čiščenja.

Dokazovanje DNK je bolj kompliciran postopek z dodajanjem barvil, ki obarvajo DNK, s fotometrično metodo dokazovanja (merjenje absorpcije - valovna dolžina 260 nm) ali z elektroforezo in drugimi postopki.

## ZAKLJUČEK

Ugotovili smo, da so se molekule DNK izločile zaradi kemijske zgradbe detergenta, ki je kot smo predvideli uničil celično in jedrno membrano in DNK se je lahko sprostila. Molekula DNK se je zaradi dodanega etanola oborila in se dvignila na gladino tako, da smo jo lahko videli s prostim očesom. Palični mešalnik je poškodoval celice in ustvaril večjo površino na katero sta detergent in sol lahko delovala. Bistvo izolacije DNA je, da uničimo strukture, ki molekulo varujejo in jo ločimo od ostalih struktur.

Z uspešno izvedenim poskusom smo dosegli oba prej zadana cilja - osvojili smo osnovne postepke izolacije DNA ter molekulo lahko tudi sami opazovali.

## LITERATURA

- S. Pevec: Biologija- Laboratorijsko delo, DZS, 2001;
- S. Pevec: Biologija- Navodila za laboratorijsko delo, DZS, 2001;
- PIK stran 45/46