



ŠOLSKI
CENTER
CELJE

IZOLACIJA DNK IZ SADJA IN ZELENJAVE

Raziskovalna naloga



AVTOR: Marcel Hribernik

MENTORICA: Irena Drofenik, univ. dipl. kem.

Celje, marec 2013

Kazalo

IZOLACIJA DNK IZ SADJA IN ZELENJAVE	1
Kazalo	2
Kazalo slik	3
Kazalo tabel	3
POVZETEK	4
ABSTRACT	4
1 UVOD	5
2 HIPOTEZA.....	6
3 TEORETIČNE OSNOVE	6
a. IZOLACIJA DNK.....	6
b. RAZISKOVALNE METODE	7
c. TEORIJA SPEKTROFOTOMETRIJE	8
d. TEORIJA MIKROSKOPIRANJA	9
4 INVENTAR IN KEMIČALIJE	10
a. INVENTAR:	10
b. KEMIČALIJE	10
5 DELO	11
a. IZOLACIJA DNK.....	11
b. MIKROSKOPIRANJE DNK.....	12
c. SPEKTROFOTOMETRIJA	12
6 MERITVE	13
a. PREGLEDNICA VSEH IZOLACIJ	13
b. RAČUNI	14
c. DOKAZ DNK.....	15
d. ČISTOST DNK.....	16
e. TEŽAVE PRI DELU	16
7 VREDNOTENJE REZULTATOV	17

a.	DOKAZ DNK.....	18
b.	NAČINI ODPIRANJA CELIC.....	18
c.	UPORABA RAZLIČNIH ALKOHOLOV	18
d.	UPORABA RAZLIČNIH TOPLJENCOV DNK.....	18
e.	SPREMEMBA TEMPERATURE ALKOHOLA.....	19
f.	ČISTOST DNK.....	19
8	ZAKLJUČEK	20
9	VIRI	21
10	VIRI SLIK	21
11	ZAHVALA.....	22

Kazalo slik

SLIKA 1:	SHEMA DVOJNE VIJAČNICE DNK.....	5
SLIKA 2:	SHEMA DVOJNEGA FOSFOLIPIDNEGA SLOJA.....	6
SLIKA 3:	FILTRIRANJE RAZTOPINE DNK IZ BANANE.....	7
SLIKA 4:	SHEMA POTOVANJA SVETLOBE V SPEKTROFOTOMETR.....	8
SLIKA 5:	SVETLOBNI MIKROSKOP.....	9
SLIKA 6:	OBARJANA DNK V LIJU LOČNIKU.....	11
SLIKA 7:	UV SPEKTROFOTOMETER.....	12
SLIKA 8:	PRIMERJAVA DNK POD MIKROSKOPOM.....	15
SLIKA 9:	POSUŠENI DNK MERITEV 7.....	17

Kazalo tabel

TABELA 1:	TABELA VSEH PARAMETROV.....	13
TABELA 2:	TABELA VSEH MAS IN MASNIH DELEŽEV DNK.....	14
TABELA 3:	TABELA RAZMERIJ ABSORBANC PROTI RAZMERJU PROTEINOV IN DNK.....	16
TABELA 4:	SKUPNA TABELA REZULTATOV.....	17

POVZETEK

V tej raziskovalni nalogi smo raziskovali, kako izolirati DNK iz celic in predvsem, kaj na količino izolirane DNK vpliva ter kako čista je. Spodbuda za nalogo je bila radovednost, kako DNK zgleda, kako se jo iz celice sploh izloči in koliko DNK je v celici. Za izolacijo DNK smo uporabili le eno metodo, a smo ji spreminjali določene parametre. Iz raziskav teh parametrov smo ugotovili najbolj idealne . Dokazali smo domnevno najbolj ugodne, ampak so bile količine izolirane DNK dosti manjše in kontaminirane, kot smo pričakovali. Izkoristek izolacije je bil le 50 %, predvidoma zaradi slabega števila odprtih celic.

ABSTRACT

In this paper, we've researched about DNA, how to isolate it from fruit cells and what affects its purity and quantity. Our incentive was curiosity about DNA, how it looks, how much DNA is in a fruit and how to isolate it from cells. In our research, we've used only one DNA isolation method, but changed conditions, under which the isolation was done. From our research we've found out under which conditions the DNA should be isolated to yield the best results. Although we've determined those conditions, the isolated DNA was not plentiful and was badly contaminated. DNA isolation was only 50% efficient, presumably from bad cell deformation.

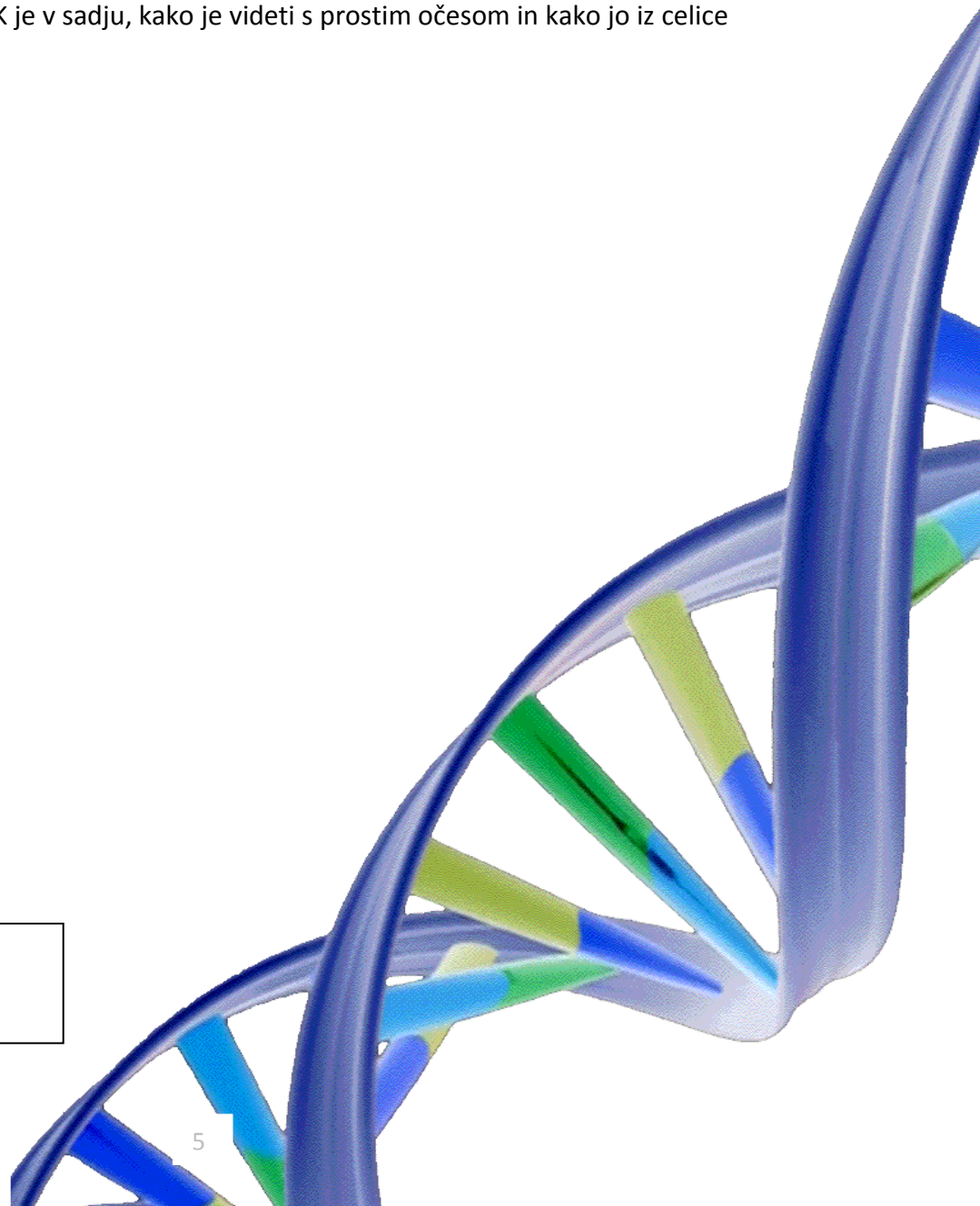
1 UVOD

DNK (v angleščini znana kot DNA) je okrajšava za dezoksiribonukleinsko kislino. Poleg RNA in proteinov je ena najpomembnejših organskih makromolekul v večini živih bitjih, spada pa med nukleinske kisline. DNK ima ključno vlogo v razvoju in delovanju živih bitij, saj je nosilka genetskih informacij. DNK je nerazvejan polimer, ki ima razen v nekaj virusih obliko dvojne vijačnice. Pri tej obliki se dve molekuli DNK ovijeta druga okoli druge. Osnovna enota DNK je nukleotid. Ta je sestavljen iz sladkorja deoksiriboza, dušikove baze adenin, citozin, gvanin in timin ter iz fosfatne skupine. Ker so lahko v vsakem nukleotidu štiri različne dušikove baze, tako tvorijo različna zaporedja in s tem različen genski zapis. DNK se pri rastlinah in živalih nahaja v celičnem jedru v organizirani obliki, imenovani kromosom. Poleg DNK se v kromosomih nahajajo še proteini, okoli katerih je DNK navit. DNK je večinoma nepolarna molekula, celice, v katerih se nahaja, pa so iz dvojnega fosfolipidnega sloja, ki je navzven polaren.

V tej nalogi bo predstavljena izolacija DNK iz celic rastlin. Te naloge smo se lotili zaradi radovednosti, koliko DNK je v sadju, kako je videti s prostim očesom in kako jo iz celice izolirati.

SLIKA 1:

SHEMA DVOJNE VIJAČNICE DNK.



2 HIPOTEZA

Na količino in čistočo izolirane DNK iz celice vplivamo z različno temperaturo, različnimi alkoholi, topljenci DNK in z različnimi načini odpiranja celic.

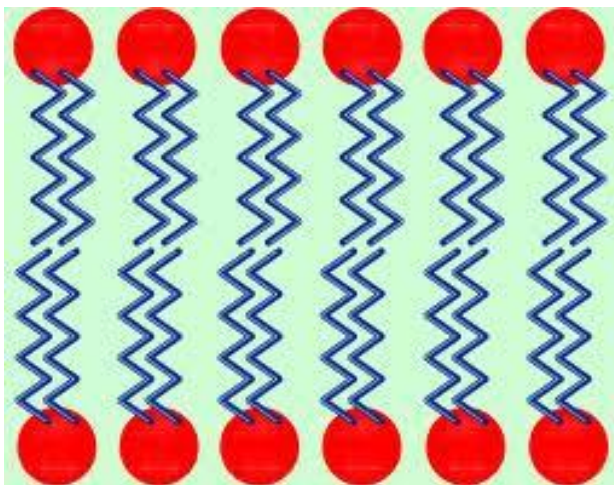
Namen te naloge je prikazati osnoven postopek izolacije DNK iz celice in ga izboljšati s spremembo temperature, uporabo drugega alkohola, mehanskim ali kemičnim načinom odpiranja celice ter preveriti čistočo DNK.

Rezultate vseh izolacij na koncu primerjamo in ovrednotimo.

3 TEORETIČNE OSNOVE

a. IZOLACIJA DNK

DNK se nahaja v jedru celice, zato moramo najti pravi način, kako to jedro odpreti. Celica je zgrajena iz dvojnega fosfolipidnega sloja. Ta je navzven polaren in ga lahko poškodujemo z detergentom, ki je prav tako polaren. Dokončno celice odpremo z mehanskimi postopki. Lahko jih pretlačimo, jih lahko raztrgamo z mešalцем ali pa jih zamrznemo, da celične stene počijo. Ko celico s pomočjo detergenta zmotimo in mehansko odpremo, se DNK v detergentu raztopi. Obarimo ga s pomočjo nepolarnega topila, in sicer alkohola. Uporabili smo etanol in izopropanol. Tega iz oborine odstranimo z nučiranjem ali s pomočjo lija ločnika. Rezultat je masa posušene DNK. DNK dokažemo s pomočjo mikroskopa. Preverimo še čistočo izolirane DNK, kar storimo s spektrofotometrijo.



SLIKA 2: SHEMA
DVOJNEGA
FOSFOLIPIDNEGA
SLOJA

Rdeče glave sloja so polarne, repi pa nepolarni. Zato se repi usmerijo skupaj in tvorijo dvojni sloj. Ta sloj lahko poškodujemo s polarnimi topili.

b. RAZISKOVALNE METODE

Za izolacijo DNK smo uporabili tri različne vrste sadja: banane, paradižnik in jabolka.

Z namenom, da bi povečali izkoristek izolacije, smo spremenili naslednje parametre:

- način odpiranja celic,
- uporabo topil DNK,
- uporabo alkohola za obarjanje,
- temperaturo,
- način odstranitve obarjene DNK.

DNK dokažemo z mikroskopom, in sicer tako, da primerjamo naše rezultate z drugimi slikami DNK. Čistost DNK preverimo s spektrofotometrom, saj se z DNK hkrati oborijo še proteini v celici.



SLIKA 3: FILTRIRANJE RAZTOPINE
DNK IZ BANANF

c. TEORIJA SPEKTROFOTOMETRIJE

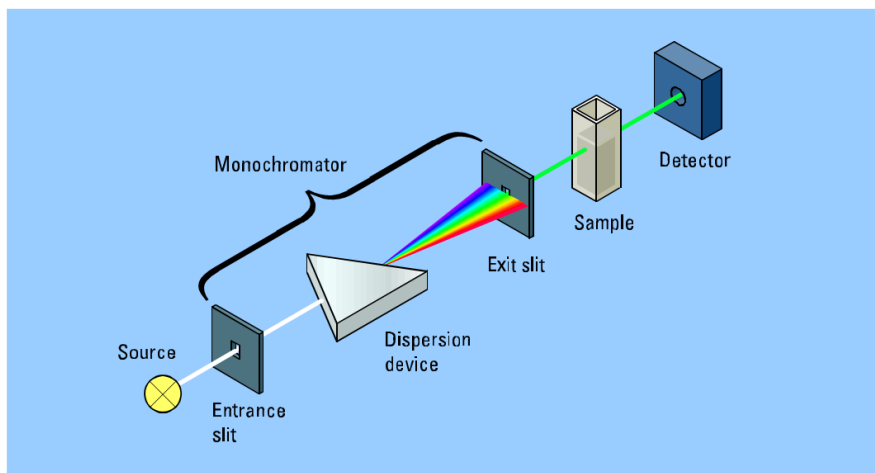
UV spektrofotometer: poznamo dve glavni vrsti spektrofotometra in sicer enožarkovni ter dvožarkovni. Dvožarkovni s pomočjo ogledala razdeli svetlobo v dva snopa. En snop potuje skozi referenčno raztopino (v našem primeru etanol) do fotodetektorja, drugi snop pa istočasno potuje skozi merjen vzorec (v našem primeru DNK+voda) do drugega fotodetektorja in izračuna razmerje po Beerovem zakonu. Enožarkovni pa zahteva dve stopnji merjenja in sicer najprej izmerimo absorbanco referenčni raztopini in nastavimo na nič in šele nato izmerimo absorbanco vzorcu.

UV spektrofotometer je optični inštrument, s katerim merimo koliko svetlobe neka snov prepušča oz jo absorbira. Sestavni deli spektrofotometra so izvor svetlobe (devterijeva ali volframova žarnica), monokromator, kiveta in fotodetektor. Z devterijevo merimo v območju med 195 nm in 375 nm za volframovo pa v območju med 350 nm in 1000 nm.

Monokromator je ponavadi sestavljen iz optične rešetke ali optične prizme lahko pa tudi iz optičnega filtra. Valovno dolžino svetlobe lahko nastavimo z spreminjanjem kota svetlobe, ki pada na optično rešetko ali optično prizmo.

Na absorbanco raztopine vplivajo lastnosti topila, pH, temperatura, koncentracija elektrolita, čas trajanja reakcije in prisotnost snovi, ki interferirajo.

*Beerov zakon: Delež absorbirane svetlobe je eksponentna funkcija koncentracije in dolžine poti svetlobnega žarka skozi vzorec.



SLIKA 4: SHEMA POTOVANJA SVETLOBE V SPEKTROFOTOMETRU

d. TEORIJA MIKROSKOPIRANJA

Svetlobni mikroskop: vsak svetlobni mikroskop je sestavljen iz optičnih in mehanskih delov. Optični deli so: okular, objektiv, kondenzor ter vir svetlobe. Mehanski deli: revolver, mikro in makro metrski vijak ter kondenzor.

V svetlobnem mikroskopu največkrat najdemo refraktivne steklene leče, včasih pa so leče tudi iz plastike ali kremenca. Naloga leč je da usmerijo svetlobo v naše oko oz. kak drug svetlobni senzor. Največja povečava svetlobnega mikroskopa, ki deluje v spektru vidne svetlobe je do 1200x z resolucijo dveh mikrometrov. Pri tako visoki povečavi uporabljamo samo eno barvo, sicer se barve različno pršijo skozi steklo, kar imenujemo kromatska aberacija (barvna napaka) To povečavo lahko presežemo z različnimi tehnikami toda slika ne bo bistra, saj nam to omejuje uklon svetlobe. Slika je vedno obrnjena, zaradi zbiralnih (konveksnih leč) leč.



SLIKA 5: SVETLOBNI MIKROSKOP

4 INVENTAR IN KEMIKALIJE

a. INVENTAR:

- čaše 250 mL, 100 mL, 50 mL, 10 mL,
- merilni valj 50 mL, 10 mL,
- kvalitativni lij,
- izparilnica,
- kristalizirka,
- kapalka,
- steklena palčka,
- nuča,
- železno stojalo,
- mufa,
- filtrirni obroč,
- filtrirni papir,
- nož,
- lesena deska,
- lij ločnik,
- spektrofotometer,
- mikroskop,
- krovno steklo,
- objektno steklo,
- spektrofotometer,
- kivete

b. KEMIKALIJE

Etanol (C_2H_5OH): Etanol je pri sobni temperaturi brezbarvna kapljevina z vnetljivimi hlapi in ostrim vonjem. Pogosto ga imenujemo kar *alkohol*, ker se z njim najpogosteje srečujemo. Najpogosteje ga srečamo v alkoholnih pijačah, v večjih količinah je strupen za telo.

R stavki: R11

S stavki: S2, S7, S16, S46

Izopropanol (C_4H_9OH): pri sobni temperaturi hlapljiva tekočina, lahko vnetljiva, vonj ima podoben etanolu.

R stavki: R11, R36, R67

S stavki: S2, S7, S16, S24/25, S26, S35, S46,

5 DELO

a. IZOLACIJA DNK

Vzorec (jabolka, paradižnik, banane) najprej mehansko obdelamo. To storimo s paličnim mešalnikom, s katerim celice raztrgamo, ali pa vzorec položimo v vrečko in ga pretlačimo. Tretja možnost je, da vzorec zamrzujemo. Nato ga damo v čašo in dodamo 90 mL deionizirane vode. Mešanico za pet minut dobro mešamo s pomočjo steklene palčke. Zatem v čašo dolijemo 15 mL detergenta Pril in še pet minut počasi mešamo. Pazimo, da pri mešanju ustvarimo čim manj mehurčkov. Mešanico potem filtriramo preko filtrirnega papirja skozi kvalitativni lij. Preostanek v filtrirnem papirju lahko odvržemo, v čašo s prefiltriranim delom pa previdno nalijemo 20 mL alkohola.

Od tu naprej smo delali na dva načina:

1. Alkohol nalijemo ob steni čaše, ampak zelo previdno, da se med vodo in alkoholom ustvari meja. Na tej meji se v roku petih minut obori DNK. Pripravimo nučo, stehtamo filtrirni papir na njej in čeznjo počasi odnučiramo vsebino čaše z DNK. To storimo počasi in previdno, da se DNK ne raztopi nazaj v vodo. Počakamo, da se filtrirni papir posuši, in ga spet stehtamo. Razlika mas je rezultat, torej masa DNK.
2. Vsebino čaše prelijemo v lij ločnik, nato pa na vrhu previdno dodamo 20 mL alkohola. Na meji se obori DNK, mi pa spodnjo fazo odlijemo skozi lij ločnik. Zgornji del z alkoholom in DNK iz lija odlijemo v kristalizirko skozi vrh, da ne pride do izgub. Počakamo, da alkohol izhlapi, v kristalizirki ostane le še DNK.



SLIKA 6:

OBARJANA DNK V LIJU LOČNIKU.

b. MIKROSKOPIRANJE DNK

Ko je DNK še v čaši z alkoholom in vodo, jo s kapalko odstranimo, kapnemo na objektno steklo in prekrijemo s krovnim steklom. Pod različnimi povečavami se prepričamo, da je v oborini prisoten DNK.

c. SPEKTROFOTOMETRIJA

Za spektrofotometrijo smo uporabili le en vzorec in sicer iz šeste meritve, kajti ta je bil najbolj uspešen. Za vzorec smo uporabili 0,02 g DNK v 20 mL vode. Najprej smo iz 20 mL vzorca s kapalko prenesli potrebno količino kivetu, položili vzorec v spektrofotometer in opravili meritev absorbanco pri 260 nm in 280 nm. Rezultat je razmerje absorbanco 260 : 280.



SLIKA 7: UV SPEKTROFOTOMETER.

6 MERITVE

Opravili smo 10 izolacij DNK. Zaradi omejenega časa žal nismo mogli kombinirati vseh parametrov, temveč smo stopnjevali parametre v smeri proti domnevanemu večjemu izkoristku. Te domneve so:

- največ DNK izoliramo, če celico zamrznemo;
- največ DNK izoliramo, če uporabimo detergent;
- največ DNK izoliramo z izopropanolom;
- največ DNK izoliramo pri hladnejših temperaturah.

Za izolacije smo uporabljali paradižnik, jabolka in banane. Izolacije pri bananah niso bile uspešne, ker se je zaradi sluzi ni dalo filtrirati, jabolka prav tako niso prinesla veliko rezultatov, zato smo večino izolacij naredili kar s paradižnikom.

a. PREGLEDNICA VSEH IZOLACIJ

TABELA 1: TABELA VSEH PARAMETROV.

Meritev	Vrsta sadja	Mehanska obdelava	Topilo DNK	Alkohol	T alkohola
1	jabolka	mečkanje	detergent	etanol	sobna temperatura
2	paradižnik	mečkanje	detergent	etanol	sobna temperatura
3	paradižnik	Palični mešalnik	detergent	etanol	sobna temperatura
4	paradižnik	palični mešalnik	detergent	izopropanol	ohlajen
5	jabolka	palični mešalnik	detergent	izopropanol	sobna temperatura
6	paradižnik	zamrzovanje	detergent	etanol	ohlajen
7	paradižnik	zamrzovanje	detergent	etanol	sobna temperatura
8	paradižnik	zamrzovanje	detergent	izopropanol	ohlajen
9	paradižnik	zamrzovanje	milo v prahu	etanol	ohlajen
10	paradižnik	zamrzovanje	milo v prahu	izopropanol	ohlajen

V tej tabeli so prikazani vsi parametri in pogoji, pod katerimi smo opravili izolacije DNK. Ohlajen alkohol je imel temperaturo 0 °C, tisti na sobni temperaturi pa 25 °C.

b. RAČUNI

Izračunati želimo masni delež DNK v sadju. Za to potrebujemo maso paradižnika in maso DNK. Paradižnik predhodno stehtamo, za maso DNK pa odštejemo maso filtrirnega papirja/kristalizirke z DNK od mase praznega filtrirnega papirja/kristalizirke.

Masni delež izračunamo po enačbi:

$$w = \frac{m(\text{DNK})}{m(\text{sadja})}$$

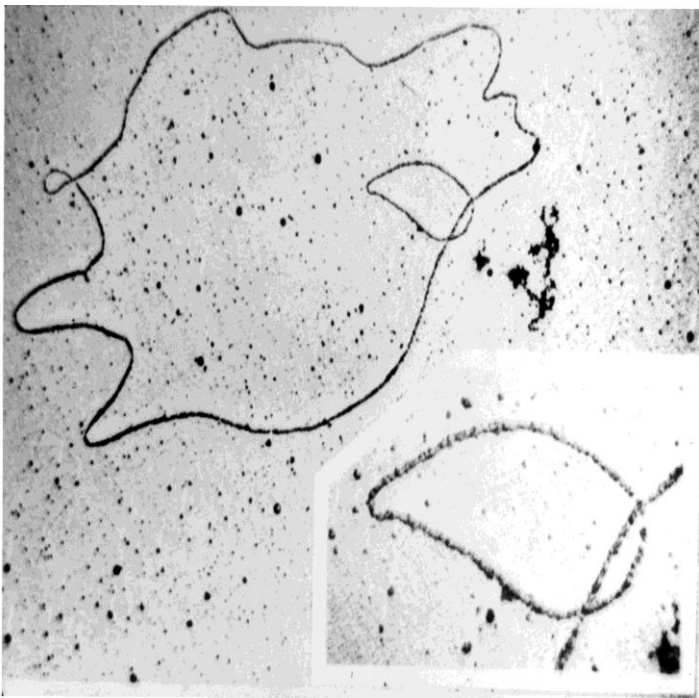
TABELA 2: TABELA VSEH MAS IN MASNIH DELEŽEV DNK.

Meritev	m (sadja)	m (DNK)	w(DNK)
1	2,13 g	0 g	0 %
2	25,56 g	0 g	0 %
3	58,32 g	0,02 g	0,03 %
4	48,29 g	0,02 g	0,04 %
5	74,40 g	0,02 g	0,02 %
6	56,55 g	0,0857 g	0,15 %
7	38,88 g	0,032 g	0,08 %
8	31,02 g	0,0308 g	0,09 %
9	43,30 g	0,031 g	0,07 %
10	74,21 g	0,045 g	0,06 %

V tej tabeli so napisane mase sadja in mase DNK v tem sadju, izračunani pa so tudi že masni deleži DNK v sadju.

c. DOKAZ DNK

DNK smo dokazali s pomočjo mikroskopa. Ker ima značilno strukturo, ga je pod mikroskopom lahko prepoznati. Ker slike mikroskopa ne moremo fotografirati, smo DNK pod mikroskopom le skicirali in primerjali s fotografijami DNK.



SLIKA 8: PRIMERJAVA DNK POD MIKROSKOPOM.

Na tej sliki primerjamo fotografijo DNK pod mikroskopom (levo) in skico DNK (desno), ki smo jo videli pod mikroskopom mi. Sliki sta si precej podobni, vendar se je naša DNK pretrgala na več manjših molekul.

d. ČISTOST DNK

Čistost DNK izračunamo s pomočjo razmerja absorbance pri 260 nm in absorbance pri 280 nm. To storimo zato, ker je DNK kontaminiran s proteini. DNK ima največjo absorbanco pri 260 nm, proteini pa pri 280 nm. Najčistejši vzorci DNK imajo razmerje $A_{260/280}$ okoli 1,8 (čista DNK ima razmerje 2,0), najbolj kontaminirani s 100 % proteinov pa okoli 0,57. Meritve so bile opravljene z vzorcem šeste izolacije, ker smo tam izolirali največje količine DNK.

$$A_{260} = 3,436$$

$$A_{280} = 2,960$$

$$A_{260/280} = \frac{A_{260}}{A_{280}} \quad A_{260/280} = \frac{3,436}{2,960}$$

$$A_{260/280} = 1,16$$

Ker razmerje ni linearno, ne moremo izračunati, koliko odstotkov proteinov je v DNK, lahko pa iz tabele domnevamo rezultate. Domnevamo lahko, da imamo v vzorcu le okoli 6 % DNK, ostalo pa so proteini.

TABELA 3: TABELA RAZMERIJ ABSORBANC PROTI RAZMERJU PROTEINOV IN DNK.

% proteinov	% DNK	Razmerje 260 : 280
100	0	0,57
95	5	1,06
90	10	1,32
70	30	1,73
0	100	2

V tej tabeli so prikazana razmerja absorbanc in odstotki proteinov ter DNK pri določenih razmerjih. Očitno je, da to razmerje ni linearno in da točnega odstotka DNK v našem vzorcu ne moremo

e. TEŽAVE PRI DELU

Izoliranje DNK iz banane smo opustili, ker se raztopljenega DNK skozi filtrirni papir ni dalo filtrirati. To nam je preprečevala sluz, ki je v banani prisotna. Težave so se pojavile še pri odpiranju celic, saj jih z mečkanjem ne odpremo skoraj nič, s paličnim mešalnikom pa prav tako bore malo. Težave so bile z dolivanjem alkohola, saj se mora med alkoholom in vodo ustvariti meja, da se DNK obori. Največja težava pa je bila, kako DNK odstraniti iz oborine, ne da bi se raztopil nazaj v vodo. Prvotni načrt je bil, da DNK s pinceto odstranimo iz oborine, a se je ni oborilo dovolj, da bi bilo to možno. Druga možnost je bila nučiranje. Tu smo bili zelo previdni, saj se je ob vsakem tresljaju DNK začel raztapljati. Končna in najboljša rešitev je bila, da DNK oborimo v liju ločniku, iz katerega nato vodo preprosto izlijemo. DNK tako ostane v alkoholu, ki izhlapi.

7 VREDNOTENJE REZULTATOV

Na količino in čistočo izoliranega DNK iz celice vplivamo z različno temperaturo, različnimi alkoholi, topljenci DNK in z različnimi načini odpiranja celic.

Spreminjali smo torej parametre, kot so temperatura, načini odpiranja celic, različni alkoholi in topljenci DNK.

TABELA 4: SKUPNA TABELA REZULTATOV.

Meritev	Vrsta sadja	Mehanska obdelava	Topilo DNK	Alkohol	T alkohola	w (DNK)
1	jabolka	mečkanje	detergent	etanol		0 %
2	paradižnik	mečkanje	detergent	etanol		0 %
3	paradižnik	palični mešalnik	detergent	etanol		0,03 %
4	paradižnik	Palični mešalnik	detergent	izopropanol	ohlajen	0,04 %
5	jabolko	palični mešalnik	detergent	izopropanol		0,02 %
6	paradižnik	zamrzovanje	detergent	etanol	ohlajen	0,15 %
7	paradižnik	zamrzovanje	detergent	etanol		0,08 %
8	paradižnik	zamrzovanje	detergent	izopropanol	ohlajen	0,09 %
9	paradižnik	zamrzovanje	milo v prahu	etanol	ohlajen	0,07 %
10	paradižnik	zamrzovanje	milo v prahu	izopropanol	ohlajen	0,06 %

Ta tabela združuje prejšnji dve tabeli. Iz te je razvidno, kako vplivajo parametri na masni delež DNK, ki ga izoliramo. Najbolj uspešna izolacija je šesta, najmanj uspešni pa prva in druga.



SLIKA 9: POSUŠENI DNK MERITVE 7

a. DOKAZ DNK

Če želimo karkoli raziskovati, moramo najprej potrditi, da smo DNK sploh izolirali. To smo storili z mikroskopom. Kot je razvidno iz slike 4, smo DNK pod mikroskopom dokazali. Nadaljevali smo z ostalimi parametri.

b. NAČINI ODPIRANJA CELIC

Uporabili smo naslednje načine: mečkanje sadja, trganje celic s paličnim mešalnikom in zamrzovanje celic. Najslabše se je obneslo mečkanje, saj nismo tako odprli skoraj nič celic. S tem postopkom torej ni bilo rezultatov. S paličnim mešalnikom smo odprli več celic, dovolj za merjenje, a še vedno veliko manj, kot je DNK dejansko v celici. Zamrzovanje se je pokazalo za najbolj uspešno, saj smo tako dobili največji masni delež celic. Različni načini odpiranja celic torej vplivajo na količino DNK, pri tem koraku se moramo najbolj potruditi, če želimo dober rezultat.

c. UPORABA RAZLIČNIH ALKOHOLOV

Alkohola, ki smo ju uporabili pri izolaciji DNK, sta etanol in izopropanol. Z etanolom smo vedno dobili malo boljše rezultate kot z izopropanolom. Torej lahko potrdimo, da uporaba alkohola za obarjanje DNK vpliva na količino obarjane DNK.

d. UPORABA RAZLIČNIH TOPLJENCOV DNK

DNK smo raztopili s pomočjo detergenta Pril in z milom v prahu. Ko celice odpremo, DNK raztopimo, da ga izločimo iz celice. Kot lahko vidimo iz tabele 3, smo z detergentom dobili boljše rezultate kot z uporabo mila v prahu. Zaradi tega lahko potrdimo, da uporaba različnih topljencev DNK vpliva na količino izolirane DNK. DNK se bolje raztaplja v detergentu kot pa v milu v prahu.

e. SPREMEMBA TEMPERATURE ALKOHOLA

Domnevamo, da se DNK lažje obori pri nižjih temperaturah. To trditev smo preverili z obema alkoholoma in dokazali, da največ DNK oborimo z ohlajenim etanolom, malo manj z ohlajenim izopropanolom, še manj z etanolom na sobni temperaturi, najmanj pa z izopropanolom na sobni temperaturi.

f. ČISTOST DNK

Čistost DNK smo določili z uporabo spektrofotometra. Čistost DNK se določi z razmerjem $A_{260/280}$, ki je bilo 1,16. Iz tega smo ugotovili, da je izoliranega DNK zelo malo in da večino našega rezultata sestavljajo proteini.

8 ZAKLJUČEK

Postavljeno hipotezo lahko v celoti potrdimo, saj so vsi zastavljeni parametri vplivali na količino izoliranega DNK. Največ smo ga izolirali z zamrzovanjem celic, uporabo detergenta in ohlajenega etanola. Uspešnost izolacij od najbolj uspešne do najmanj je naslednja:

- zamrznitev sadja, uporaba detergenta in ohlajenega etanola;
- zamrznitev sadja, uporaba detergenta in ohlajenega izopropanola;
- zamrznitev sadja, uporaba detergenta in etanola na sobni temperaturi;
- zamrznitev sadja, uporaba mila v prahu in ohlajenega etanola;
- zamrznitev sadja, uporaba mila v prahu in ohlajenega izopropanola;
- uporaba paličnega mešalnika, detergenta in ohlajenega izopropanola;
- uporaba paličnega mešalnika, detergenta in etanola na sobni temperaturi;
- uporaba paličnega mešalnika, detergenta in izopropanola na sobni temperaturi;
- mečkanje sadja v nobenem primeru ni prineslo rezultatov.

Masni delež DNK pri teh parametrih je bil 0,15 %. V paradižniku je približno 0,3 % DNK, torej je imela najuspešnejša izolacija DNK 50 % izkoristek. Dokazali smo ga z mikroskopom in preverili čistost s spektrofotometrom. Čistost DNK je bila zelo majhna, le okoli 6 % dobljenega vzorca DNK je bilo dejansko DNK, ostalo pa proteini, ki so v jedru z DNK. Rezultate lahko ocenimo kot dokaj dobre, saj so vsi parametri dokazani, le čistoča DNK je vprašljiva. Za nadaljnje raziskave bi lahko uporabili več vrst sadja, še druge alkohole, lahko bi tudi poskusili izolirano DNK očistiti proteinov.

9 VIRI

- Wikipedia: The free encyclopedia: [Citirano 10. Marec 2013; 16:45] Dostopno na spletnem naslovu: http://en.wikipedia.org/wiki/Nucleic_acid_quantitation
- WikiEducator: free elearning content: [Citirano 8. Marec 2013; 20:52] Dostopno na spletnem naslovu: http://wikieducator.org/Lab:DNA_extraction
- Wikipedia the free encyclopedia: [citirano 8. Marec 2013; 21:18] Dostopno na spletnem naslovu: http://en.wikipedia.org/wiki/DNA_extraction
- Learn.Genetics: [Citirano 8. Marec 2013; 18:33] Dostopno na spletnem naslovu: <http://learn.genetics.utah.edu/content/labs/extraction/howto/>
- Protocol Online: [Citirano 4. Marec 2013; 14:25] Dostopno na spletnem naslovu: http://www.protocol-online.org/prot/Molecular_Biology/DNA/DNA_Extraction_Purification/DNA_Extraction_from_Plants/index.html
- The Jacks Lab: [Citirano 4. Marec 2013; 15:42] Dostopno na spletnem naslovu: http://web.mit.edu/jacks-lab/protocols/DNA_Isolation_tables.html
- KhanAcademy: [Citirano 3. Marec 2013; 18:54] Dostopno na spletnem naslovu: <https://www.khanacademy.org/science/chemistry/chemical-reactions-stoichiometry/v/spectrophotometry-introduction>
- Wikipedia: Prosta enciklopedija: [Citirano 3. Marec 2013; 19:27] Dostopno na spletnem naslovu: <http://sl.wikipedia.org/wiki/Mikroskop>

10 VIRI SLIK

- NASLOVNA SLIKA: [Citirano 4. Marec 2013; 16:51] Dostopno na spletnem naslovu: <http://theobsessivechef.blogspot.com/2011/04/not-your-mothers-tomato-soup-but-with.html>
- SLIKA 1: SHEMA DVOJNE VIJAČNICE DNK: [Citirano 4. Marec 2013; 17:24] Dostopno na spletnem naslovu: <https://team.inria.fr/zenith/files/2013/01/health-dna-backgrounds-powerpoint.gif>
- SLIKA 2: SHEMA DVOJNEGA FOSFOLIPIDNEGA SLOJA: [Citirano 4. Marec 2013; 17:38] Dostopno na spletnem naslovu: http://www.austincc.edu/rlewis3/lipid_bilayer/model.html
- SLIKA 4: SHEMA POTOVANJA SVETLOBE V SPEKTROFOTOMETER: [Citirano 4. Marec 2013; 17:51] Dostopno na spletnem naslovu: <http://kootation.com/california-adventure-map-2011-sindhu-bhairavi-veer-photos.html>

- SLIKA 5: SVETLOBNI MIKROSKOP [Citirano 8. Marec 2013; 21:36] Dostopno na spletnem naslovu: <http://www.amazon.com/My-First-Lab-Duo-Scope-Microscope/dp/B000NOU54O>
- SLIKA 8: PRIMERJAVA DNK POD MIKROSKOPOM [Citirano 8. Marec 2013; 22:44] Dostopno na spletnem naslovu: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:DNA_Under_electron_microscope_Image_3576B-PH.jpg

11 ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici gospe Ireni Drogenik, ki mi je ves čas pomagala pri raziskovalni nalogi in mi je svetovala na vsakem koraku pri delu. Zahvaljujem se gospe Andreji Tkalec, kije vestno lektorirala raziskovalno nalogo. Zahvaljujem se gospe Miheli Jug, ki mi je vedno priskočila na pomoč pri praktičnem delu raziskovalne naloge. Zahvaljujem se gospe Mojci Drogenik-Čerček, ki mi je priskrbela gradivo za raziskovalno nalogo. Zahvaljujem se Žanu Bevčarju, ki mi je pomagal pri praktičnem delu z idejami in delom.