



OSNOVNA ŠOLA PRIMOŽA TRUBARJA LAŠKO

**OVREDNOTENJE OKOLJU PRIJAZNEGA POSTOPKA  
ZA KOLIČINO IZOLIRANE DNA  
IZ EKOLOŠKEGA IN BIOLOŠKEGA OKOLJA**

*(RAZISKOVALNO DELO)*

**AVTORICI:** Ana Blatnik in Taja Jančič

**RAZRED:** 9.

**MENTORJA:** Marko Jeran, kem. teh.

Milena Žohar, prof. kem. in biol.

**KRAJ IN ŠOLSKO LETO:** Laško, 2013/2014

Zahvaljujema se mentorjema g. Marku Jeranu in prof. Mileni Žohar za mentorstvo, pomoč ter napotke pri pisanju raziskovalnega dela. Hvala vama za čas, ki sta nama ga namenila. Vedno sta bila na razpolago, ko sva imeli kakšne nejasnosti, za kar se vama še enkrat zahvaljujema.

Zahvaljujema se tudi šoli in ravnateljici, ga. Ljudmili Pušnik, ki nama je omogočila sredstva in prostor za izvedbo raziskovalnega dela.

Hvala prof. Lidiji Toplišek za skrben pregled pisnega dela in njene nasvete pri oblikovanju.

Za tehnično pomoč in napotke hvala Blanki Gorišek.

Vsakemu posebej še enkrat hvala

**KAZALO VSEBINE:**

1.	POVZETEK .....	5
2.	UVOD .....	6
2.1	METODE DELA.....	6
3.	TEORETIČNI DEL .....	7
3.1	OSNOVNI POJMI GENETIKE – KROMOSOMI IN GENI .....	8
3.1.1	KROMATIDA .....	9
3.1.2	GEN .....	9
3.1.3	ALELI .....	10
3.2	DEOKSIRIBONUKLEINSKA KISLINA – DNA .....	10
3.2.1	ODKRITJE DNA .....	10
3.2.2	STRUKTURA DNA.....	11
3.2.3	UPORABA DNA .....	12
3.2.4	PODVOJEVANJE DNA.....	13
3.2.5	TRANSKRIPCIJA.....	14
3.2.6	GENSKI KOD .....	14
3.2.7	UPORABA V FORENZIKI.....	15
3.2.8	GENSKI INŽENIRING.....	15
3.3	METODE IZOLACIJE DNA IZ REALNIH VZORCEV .....	16
3.4	NAČRT IZOLACIJE DNA.....	16
3.5	HIPOTEZA .....	21
4.	EKSPERIMENTALNI DEL .....	22
4.1	UVOD K EKSPERIMENTOM.....	23
4.2	UPORABLJENI INVENTAR.....	23
4.3	REAGENTI IN RAZTOPINE .....	24
4.4	MODELNI REALNI VZORCI.....	24
4.5	OPIS POSTOPKOV IZOLACIJE DNA.....	25

4.5.1	SPLOŠEN POSTOPEK IZOLACIJE DNA .....	25
4.5.2	IZOLACIJA DNA S TERMOSTATIRANJEM .....	25
4.5.3	IZOLACIJA DNA Z UPORABO KREMENČEVEGA PESKA.....	26
4.5.4	IZOLACIJA DNA IZ KONJSKEGA IZTREBKA.....	26
5.	REZULTATI IN DISKUSIJA .....	27
5.1	OPAŽANJA .....	28
5.2	REZULTATI MERITEV.....	28
5.2.1	SPLOŠEN POSTOPEK IZOLACIJE DNA .....	28
5.2.2	IZOLACIJA DNA S TERMOSTATIRANJEM .....	33
5.2.3	IZOLACIJA DNA Z UPORABO KREMENČEVEGA PESKA.....	34
5.2.4	IZOLACIJA DNA IZ STARANIH VZORCEV .....	36
5.2.5	IZOLACIJA DNA IZ KONJSKEGA IZTREBKA.....	38
6.	ZAKLJUČEK.....	39
7.	LITERATURA.....	41
8.	DODATEK.....	43
8.1	VARNOSTNA OPOZORILA KEMIKALIJ.....	43
8.2	PRIMER IZRAČUNA MASNEGA DELEŽA DNA V VZORCU .....	43

**KAZALO TABEL:**

Tabela 1: Pregled osnovnih uporabljenih vzorcev, njihovih družin, nahajališč in opisov (korenin – K, stebel – S, listov – L, cvetov – C in plodov – P) [16, 17] .....	21
Tabela 2: Prikaz uporabljenih sadežev, vrste, porekla, mase in deleža izolirane DNA .....	28
Tabela 3: Pregled izolirane DNA v vzorcih zelenjave .....	31
Tabela 4: Pregled izolirane DNA v termostahiranih vzorcih, segreto sadje z ohlajanjem v hladilniku (1) in brez ohlajanja v hladilniku (2) .....	33
Tabela 5: Opis vzorca kolerabe in vsebnost izolirane DNA v njem .....	34
Tabela 6: Pregled izolirane DNA v grozdju s kremenčevim peskom .....	35
Tabela 7: Pregled izolirane DNA v vzorcih starane zelenjave .....	36
Tabela 8: Pregled izolirane DNA v vzorcu konjskega iztrebka .....	38

**KAZALO SLIK:**

Slika 1: Prikaz kromosoma in nahajališče centromera, kjer se kromatidi sekata [5] .....	8
Slika 2: Prikaz celotnega kromosoma in niti delitvenega vretena [11] .....	9
Slika 3: Molekula DNA (levo) in njena zgradba z organskimi bazami (desno) [12] .....	11
Slika 4: Fosfatni skelet DNA z ustreznimi sladkorji [13] .....	12
Slika 5: Prikaz podvojevanja DNA [14] .....	13
Slika 6: Kodoni v molekuli RNA [15] .....	14
Slika 7: Ločevanje zmesi pri vzorcu grozdja .....	31
Slika 8: Ločevanje zmesi pri vzorcu banane .....	29
Slika 9: Uporabljeni reagenti in kemikalije za izolacijo .....	30
Slika 10: DNA vijačnica jabolka pod mikroskopom (60-kratna povečava) .....	30
Slika 11: Izolacija DNA iz rdečega zelja .....	34
Slika 12: Vijačnica DNA v vzorcu kolerabe (40-kratna povečava) .....	32
Slika 13: DNA vzorca kolerabe pod mikroskopom na 100-kratni povečavi .....	32
Slika 14: Ločevanje zmesi pri vzorcu kuhane banane .....	34
Slika 15: Ločevanje izolacijske mešanice v zmesi pri staranem paradižniku .....	37
Slika 16: Ločevanje zmesi konjskega iztrebka .....	40
Slika 17: DNA konjskega iztrebka .....	38

**KAZALO GRAFOV:**

Graf 1: Pregled deleža vsebnosti DNA v vzorcih sadja .....	29
Graf 2: Pregled vsebnosti izolirane DNA v vzorcih zelenjave .....	31
Graf 3: Pregled vsebnosti izolirane DNA s prehodno termostatično obdelavo .....	33
Graf 4: Primerjalni pregled vsebnosti DNA glede na mehansko in fizično obdelavo vzorca kolerabe .....	35
Graf 5: Primerjalni pregled vsebnosti DNA glede na mehansko in fizično obdelavo vzorca grozdja .....	36
Graf 6: Primerjava vsebnosti izolirane DNA v vzorcih starane zelenjave .....	37

## 1. POVZETEK

Raziskovalno delo opisuje ovrednotenje in uporabo metode izolacije DNA iz bioloških in ekoloških vzorcev. Metoda je za izvedbo in rokovanje hitra in enostavna, iz ekološkega vidika pa okolju prijazna in komercialna, saj vsebuje reagente, s katerimi je moč rokovati v pedagoški praksi (NaCl, detergent za pomivanje posode, tekočina za kontaktne leče). V delu opisujemo kvalitativni pristop k izolaciji DNA iz vzorcev splošne rabe. Na količino sproščene DNA iz celic vplivajo različni dejavniki, kot npr. temperatura, starost vzorca in mehanska oz. fizična obdelava vzorca. Največji delež DNA se sprosti pri mehanski obdelavi vzorca, saj ima fizična dosti pomanjkljivosti. Pri višji temperaturi in daljši časovni izpostavljenosti DNA razpada in s tem se njena funkcija prekine. Pri nižjih temperaturah ne opazimo bistvenih sprememb, kar predstavlja velik plus pri skladiščenju biološkega materiala v medicinskih in biokemijskih krogih. V sklopu dela je bila testirana serija vzorcev vsakdanje rabe, vanj je bil vključen tudi modelni primer iztrebka. Rezultati kažejo, da je možno obravnavani postopek uporabiti za izolacijo konkretnega biološkega materiala (primer konjski iztrebki), kar predstavlja dodatno vrednost metodi, ki je bila razvita samo za živila.

**Ključne besede:** DNA, biološki in ekološki vzorci, okolje, sadje, zelenjava, iztrebki, laboratorijsko delo.

## 2. UVOD

DNA, nosilka dednih informacij, je pomembna komponenta vsakega živega bitja. V današnjem času kemikom in biologom predstavlja ta obetavna molekula velik izziv pri proučevanju njenih lastnosti. Med osrednje lastnosti vključujemo tudi izolacijo, ki je ključnega pomena pri nadaljnjih biokemijskih transformacijah.

Osrednja rdeča nit izvedbe raziskovalnega dela, vezana na izolacijo DNA, nas je navdušila predvsem po izsledkih realnega raziskovalnega problema, ki je bil vezan na izolacijo dedne molekule iz krvnega strdka. V omenjenem okolju je bilo v izolacijo vključenih polno »neobičajnih« reagentov in aparaturo, katerih rabe nismo vešč. Navkljub vsemu se zavedamo komercialne in ekonomske težnosti in smo želeli uporabiti povsem okolju prijazen in ekološko sprejemljiv postopek, slednjega v nadaljevanju aplicirati na različne vzorce in preučevati tako kvalitativne kot kvantitativne vidike izolacije.

Postopek smo v nadaljevanju optimizirali na različnih virih vzorcev. Kot končni rezultat smo pokazali modelni primer vzorca v razredu. Demonstracija izolacije DNA je pouk popestrila in omogočila širši pogled na to nadvse čudovito molekulo.

### 2.1 METODE DELA

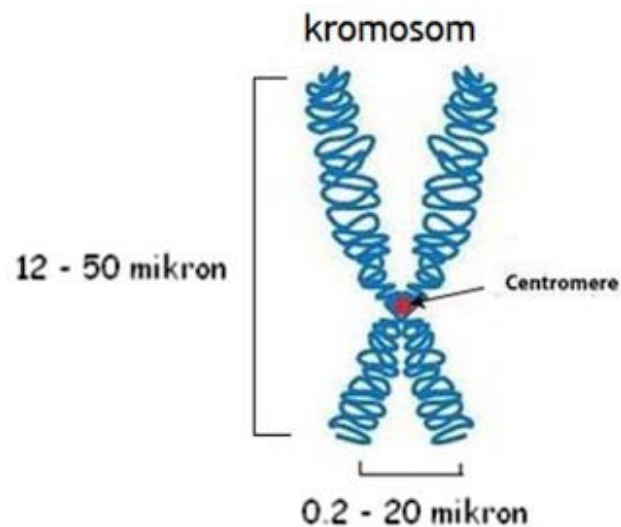
Poskuse smo izvedli v šolskem laboratoriju. Vse potrebne pripomočke in opremo je priskrbelo šola. Pri delu smo uporabljali vsa zaščitna sredstva in ravnali ustrezno po predpisih. Odpadke smo zbirali v posebnih posodah in jih po izvedbi ustrezno pretvorili. Delo je bilo vezano na biološki material, kateremu smo posebej posvetili več pozornosti.



### 3. TEORETIČNI DEL

### 3.1 OSNOVNI POJMI GENETIKE – KROMOSOMI IN GENI

Kromosom je nitasta struktura, sestavljena iz DNA, histonov in beljakovin. V celičnem ciklusu so kromosomi najbolj vidni med mitozo in mejozo, saj je takrat genetski material zgoščen in razporejen v sredini citoplazme, medtem ko je običajno razpršen po jedru. Število in zgradba kromosomov so značilni za vrsto evkariontskega organizma. Pri različnih vrstah evkariontov je število kromosomov različno [1].



Slika 1: Prikaz kromosoma in nahajališče centromera, kjer se kromatidi sekata [5]

Molekula DNA, je spiralno zvita dvojna vijačnica, ki se ovije okoli histonskih beljakovin. Tako nastane nukleosom. Zaradi več nukleosomov, ki se zvijejo skupaj, nastanejo nukleosomski paketi. Ko se več paketov zgosti, nastane kromatin ali kromatinsko vlakno. Več skupaj se jih zgošča in okoli centromera oblikujejo kromosom. Če celica ni v fazi delitve, kromosomi v celičnem jedru niso vidni niti pod mikroskopom. Med celično delitvijo se DNA v kromosomu tesno strne in kromosomi postanejo vidni [1].

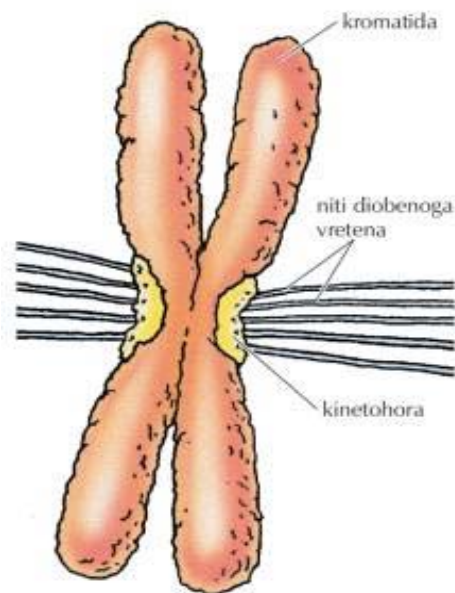
### 3.1.1 KROMATIDA

Kromatida je ena od obeh kopij kromosoma, nastala s podvojitvijo DNA. V centromeru je še vedno povezana z drugo kopijo. Kromatidi istega kromosoma sta genetsko enaki. Kromosomi, zgrajeni iz dveh kromatid, se pojavljajo v profazi in metafazi mitoze [2].

### 3.1.2 GEN

Gen je umestljiva regija genomskega zaporedja in ustreza enoti dedovanja, pridruženi regulatornim regijam, prepisljivim regijam ali drugim regijam funkcionalnega zaporedja. Gen predstavlja tudi zapis za eno beljakovino ali molekulo RNA v molekuli DNA in predstavlja manjši odsek molekule DNA [3].

Kadar je gen aktiven, se kodirajoče zaporedje v procesu transkripcije (prevajanja) prepíše, pri čemer nastane kopija RNA v genu vsebovanih podatkov. Ta RNA lahko nato na podlagi genskega koda usmerja sintezo proteinov. Nekatere RNA se uporabijo neposredno, npr. kot deli ribosomov. Molekule, ki nastanejo z izražanjem genov, bodisi RNA ali proteini, so genski produkti [4].



Slika 2: Prikaz celotnega kromosoma in niti delitvenega vretena [11]

### 3.1.3 ALELI

Alel je ena od različic istega gena na genskem lokusu, ki so prisotne v populaciji osebkov iste vrste. Razlike v zaporedju DNA različnih alelov, se lahko izražajo kot razlike v fenotipski lastnosti (npr. barvi). Pogosto razlike niso očitne.

Večina mnogoceličarjev je diploidnih. Njihov genotip sestoji iz para homolognih kromosomov. Imajo dva alela za vsak gen. Če sta oba alela enaka, pravimo, da je osebek homozigot, sicer je heterozigot. V celotni populaciji je lahko prisotnih več alelov, vendar lahko diploidni osebek od staršev podeduje samo dva od njih. Število alelov in njihova porazdelitev v populaciji je eno od meril genetske raznolikosti [3, 4].

## 3.2 DEOKSIRIBONUKLEINSKA KISLINA – DNA

DNA oziroma deoksiribonukleinska kislina je molekula, ki nosi zapis za genetske informacije v vseh živih organizmih. DNA je nerazvejan polimer z osnovno enoto, ki jo imenujemo nukleotid. Njegova sestava omogoča celici opravljanje več različnih nalog: shranjevanje energije v visoko-energetskih vezeh, shranjevanje genetske informacije in usmerjanje sinteze beljakovin [6].

### 3.2.1 ODKRITJE DNA

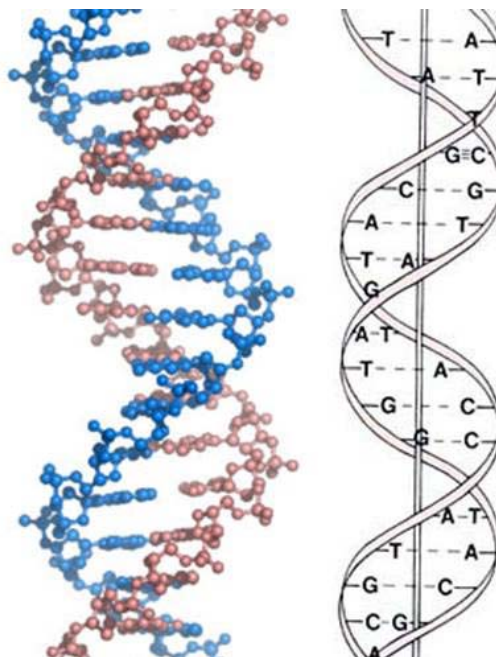
Mendlu priznavamo odkritje genov. Natančno je preučeval njihov prenos od generacije do generacije, vendar ni vedel, kaj natančno geni so. Šele leta 1933, si je Nobelov nagrajenec za genetiko Thomas Morgan med predavanjem ob podelitvi nagrade postavil isto vprašanje. Čeprav je med Mendlom in Morganom preteklo veliko časa, pristnega odgovora na to vprašanje niso našli. Šele sredi dvajsetega stoletja so nastale primerne tehnične osnove za takšne raziskave.

Odkritje nukleinskih kislin ni posebno novo. Že leta 1869 je kemik Miescher izoliral iz celičnih jeder snov, bogato s fosforjem. Imenoval jo je nuklein, ker jo je izoliral iz jeder. Konec devetnajstega stoletja so že poznali heterociklične baze, ki so sestavni del nukleinskih kislin. Leta 1930 je bilo znano, da obstaja DNA in RNA. Leta 1940 so ugotovili, da je DNA dolga, nerazvejana molekula oz. polimer, sestavljen iz monomerov

in nukleotidov. Angleški znanstveniki O. T. Avery, M. McCarty in M. MacLeod so leta 1944 dokazali, da je DNA genetski material, ki je odgovoren za dedovanje in informacije v celicah [6].

### 3.2.2 STRUKTURA DNA

DNA je sestavljena iz ponavljajočih se podenot in nukleotidov, ki so zgrajeni iz fosfatne skupine, baze in pentoze, 2-deoksiriboze. V DNA so običajno štiri vrste baz. Organske baze so: adenin (A), gvanin (G), timin (T) in citozin (C). Bazi z dvojnimi obroči sta adenin in gvanin. Imenujeta se purina. Bazi timin, citozin sta iz enojnega obroča in ju imenujemo pirimidini. Molekula DNA je običajno v obliki dvojnega heliksa (dvojne vijačnice). V DNA je količina timina enaka količini adenina, količina citozina pa količini gvanina. Pri različnih organizmih se lahko razmerje  $(T+A):(C+G)$  zelo razlikuje [7].

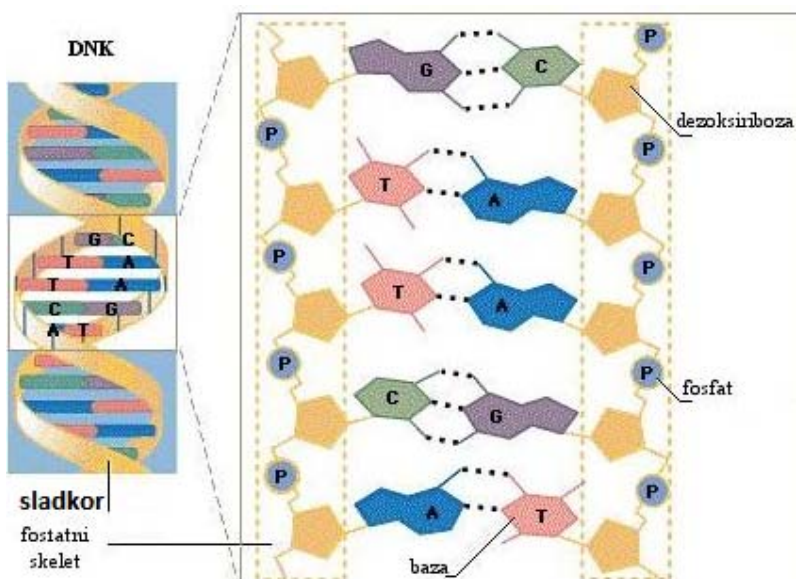


Slika 3: Molekula DNA (levo) in njena zgradba z organskimi bazami (desno) [12]

Fosfodieterske vezi so povezave nukleotidov polinukleotidske verige DNA, ki nastanejo med tretjim ogljikovim atomom ene in petim ogljikovim atomom druge deoksiriboze. Polinukleotidni verigi sta med seboj povezani z dvojno vijačnico z vodikovimi vezmi, in sicer med ustrežajočimi komplementarnimi bazami. Med

seboj se povezujejo le določene baze (parjenje baz je specifično). Med adeninom in timinom so tako kot med gvaninom in citozinom vodikove vezi. Celotni verigi DNA sta komplementarni. Prav to je razlog, zaradi katerega je DNA idealna za shranjevanje informacij in njihov prenos na potomce.

V enem zavoju DNA najdemo približno 10 razvrščenih baz. Pomembna je tudi kemijska polarnost, saj sta verigi nasprotno vzporedni. To je potrebno za podvajanje DNA in drugih procesov [7].



Slika 4: Fosfatni skelet DNA z ustreznimi sladkorji [13]

### 3.2.3 UPORABA DNA

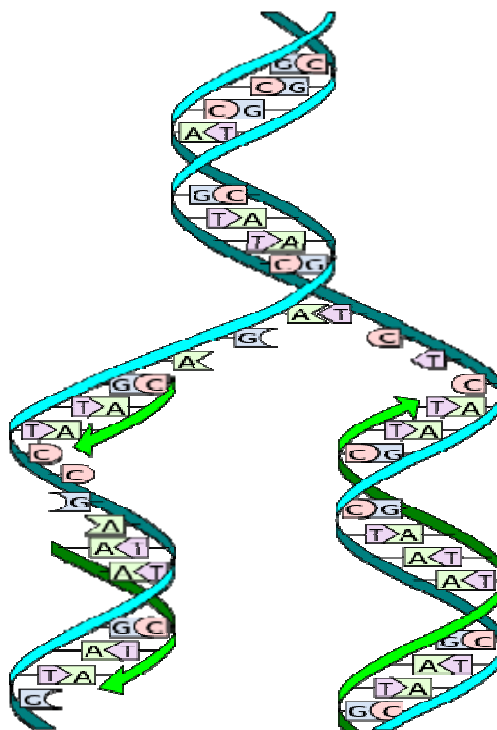
*Transformacija* je način prenosa DNA in s tem genetskih informacij iz ene v drugo celico. Pri tem celice niso v medsebojnem kontaktu in tudi virusi ne sodelujejo. Prenaša se le gola DNA. Transformacijo je leta 1928 odkril Griffith, vendar ni mogel dokazati ključnega pomena molekule pri tem prenosu [7].

*Markiranje* molekul je postopek vnašanja lahko prepoznavnih sestavin vanje. Za markiranje so zelo primerni različni izotopi tistih elementov, ki jih živa bitja potrebujejo za življenje. S primernimi metodami lahko zasledujemo, kaj se dogaja v organizmu s »podtahnjenimi« izotopi [7].

### 3.2.4 PODVOJEVANJE DNA

Pri razmnoževanju se v potomstvo genetska informacija prenese iz DNA. To pomeni, da se morajo podvojovati tudi deoksiribonukleinske molekule. Nastanek komplementarnih parov baz je osnova podvojevanja. Pri tem se obe verigi DNA ločita in ob vsaki od njiju nastane še ena veriga. Tako je vsaka od novih DNA sestavljena iz ene stare in ene nove verige. Ta mehanizem podvojevanja se imenuje semikonzervativen način. Vse molekule DNA se ne glede na svojo obliko tako podvojujejo. Podvajanje se začne na specifičnem mestu, ki ni vedno na začetku molekule DNA. Specifični proteini so tisti, ki prepoznavajo podvojevalno mesto.

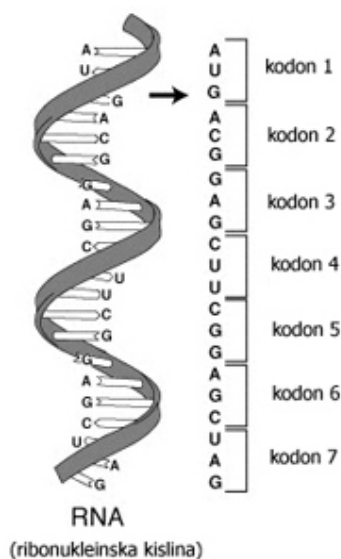
Od tu poteka podvojevanje v obe smeri, vendar vedno znova le v smeri od ogljikovega atoma 3' ene molekule deoksiriboze proti ogljikovemu atomu 5' druge molekule deoksiriboze. Mesto razhajanja dvojne vezi DNK, imenujemo podvojevalne (replikacijske) vilice [7].



Slika 5: Prikaz podvojevanja DNA [14]

### 3.2.5 TRANSKRIPCIJA

Pri transkripciji nastane mRNA. Ker se zapis za enako beljakovino nahaja le na delu molekule DNA, se na mRNA prepíše le določen del molekule DNA. Restripcijski encimi ponovno razcepijo vodikove vezi med dušikovimi bazami, a le na delih, kjer je zapisana informacija za nastanek ene beljakovine. Ko sta verigi ločeni, se encim RNA polimera veže le na eno verigo in sicer na prvo dušikovo bazo kompleksa z zapisom za beljakovino. Kompleksu se približa ustrezen nukleotid, ki se poveže z dušikovo bazo, RNA polimeraza se pomakne naprej. Ponovno se približa ustrezen nukleotid, ki se po vezavi z naslednjo bazo na DNA verigi poveže z že prej vezanim nukleotidom na novo nastali mRNA verigi. Riboza (iz 1. nukleotida) se veže s fosfatno skupino (2. nukleotida), pri tem pa se 1. loči od DNA verige. To traja, dokler ni na mRNA celotnega zapisa za nastanek ene beljakovine [6].



Slika 6: Kodoni v molekuli RNA [15]

### 3.2.6 GENSKI KOD

Kodoni ali enote, ki določajo vgradnjo posameznih aminokislin, so sestavljeni iz kombinacij štirih možnih osnovnih informacij – štirih baz: A, T, G in C. V peptidne verige se lahko vgrajuje vseh 20 aminokislin, kar pomeni, da mora biti na razpolago vsaj 20 različnih kodonov (za vsako aminokislino eden). Če bi vsak



kodon sestavljali po dve bazi, bi bilo torej kombinacij premalo; če predpostavimo, da so kodoni sestavljeni iz treh baz, jih je več kot dovolj. Stalnemu zaporednemu upoštevanju po treh baz pravimo čitalni okvir. V primeru nastanka nefunkcionalnih peptidov (če pride do mutacij), se v takih primerih pojavi kodon, ki pove konec sinteze – stop kodon. Genski kod je generiran, zato mora biti na razpolago več različnih tRNA, ki prepoznajo različne kodone za določene aminokislino. Poznamo še antikodone, ki omogočajo parjenje tretje baze z različnimi bazami. Takšne baze imenujemo majave baze.

### 3.2.7 UPORABA V FORENZIKI

Čeprav je molekula DNA prostemu očesu nevidna, je postala eno najmočnejših orodij proti zločinu. Komaj dvajset let po prvi analizi prstnih odtisov DNA je forenzična identifikacija na podlagi te molekule postala odločilen ključ pri sojenju osumljencu. Metodo samo kot tako je leta 1984 odkril Alec J. Jeffreys. Forenziki lahko izolirajo DNA iz las, krvi, kože s prizorišča zločina [8]. Pri tem so primerjane baze odvečne DNA, katerih zaporedja so odvisna od človeka do človeka. Metoda je zelo zanesljiva za identifikacijo ujemajoče DNA. Poleg splošne forenzike poznamo tudi forenzično antropologijo, ki se običajno uporablja za identifikacijo skeletnih ostankov človeka, in forenzično DNA analizo, ki zahteva uporabo unikatne človekove DNA, da odgovori na vprašanja, kot je npr. očetovstvo. DNA lahko forenziki uspešno izolirajo iz različnih bioloških sledi. Metode izoliranja se ločijo glede na vrsto biološke sledi, podlage in ohranjenosti. Velikokrat je potrebno DNA očistiti primesi. Izolacija se ponavadi zaključi s koncentriranjem DNA, saj je volumen letga pri dodajanju v PCR-reakcijo omejen (verižna reakcija s polimerazo). Nepravilen vnos količine DNA v PCR-reakcijo lahko privede do neuspeha pri profiliranju DNA zaradi njegove prenizke količine v reakcijski PCR-raztopini [8].

### 3.2.8 GENSKI INŽENIRING

Genski inženiring (GI) omogoča znanstvenikom, da z manipulacijo genov ustvarijo rastline, živali in mikroorganizme na način, ki se ne pojavlja v naravi in s tradicionalnimi tehnikami križanja ne more biti dosežen. Geni bakterij, virusov, rastlin in živali so vstavljeni v zrna soje, koruze, semena oljne ogrščice in bombaža. Slednje se goji kot poskusne poljščine, poznane kot gensko spremenjeni organizmi (GSO). Ti pridelki so ustvarjeni z namenom doseganja odpornosti na določene pesticide in herbicide, ki jih proizvajajo

iste multinacionalke, ki prodajajo tudi semena GS rastlin. Ti se procesirajo za uporabo kot hrana, krma za živali, v tekstilu in se prodajajo po vsem svetu [9].

### **3.3 METODE IZOLACIJE DNA IZ REALNIH VZORCEV**

DNA lahko preprosto izoliramo iz mesa, sadja ali zelenjave tudi z uporabo vsakdanjih gospodinjskih pripomočkov. Vir DNA zmeljemo v multipraktiku v slani vodi, ki bo vzdrževala ozmotsko ravnotežje in bo hkrati preprečevala denaturacijo DNA. Celične membrane dodatno raztopimo s pomočjo detergenta. Proteine, vezane na DNA, odstranimo s tekočino za čiščenje kontaktnih leč, ki vsebuje proteolitične encime. Ciljno molekulo oborimo tako, da znižamo polarnost raztopine, v kateri se le-ta nahaja. Slednji korak izvedemo z uporabo etanola [10].

Poznamo veliko kompleksnih postopkov izolacij, ki jih dnevno izvajajo v veliko laboratorijih po svetu. Za pridobivanje DNA uporabljajo temu primeren inventar in dodatne pufre (sredstva za vzdrževanje konstantnega pH okolja).

### **3.4 NAČRT IZOLACIJE DNA**

DNA je biološka molekula, ki vsebuje dedni material. Cilj dela je pridobiti z metodami izolacije čim večjo maso in fizično dobro ohranjeno DNA. Vzorce izolirane DNA smo po izolaciji opazovali pod mikroskopom. Maso izolirane komponente smo določili s tehtanjem, glede na izhodnih 100 g vzorca smo na koncu izračunali še pripadajoč masni delež (%).

Za izolacijo DNA smo izbrali naslednja živila: banano, jabolko, grozdje, slive, endivijo solato, zeleno zelje, jedilno bučo ali tikvo, blitvo, paradižnik, krompir, rdečo peso, redkev, korenje, kolerabo in rdeče zelje.

Večina živil, s katerimi smo izvajali eksperiment, je bila sezonskih. Vzorce smo kupili v trgovinah z živili ali nabrali na domačem vrtu. Poskrbeli smo za številčne in raznolike vzorce.

Uporabljeno sadje in zelenjavo, ki je razvrščeno glede na taksonomsko funkcijo, predstavlja naslednja tabela.

Ime živila	Latinsko ime	Familia	Nahajališče, rastišče	Opis rastline
Banana	<i>Musa sp.</i> »Dwarf <i>cavendish</i> «  <i>Bananovec</i>	<i>Musaceae</i>  (Bananovčevke)	Indija, Ekvador, Brazilija, Srednja Amerika, Filipini	K: podzemna korenika s stoloni S: «deblo» je iz ostankov listnih baz pokončnih listnih nožnic in se ne razveja L: izraščajo na vrhu v šopu, spiralasto nameščeni na kratkem peclju C: rumene barve združeni v klasih, ovojni listi so suličasti in vijoličasti P: banana
Jabolka	<i>Malus sp.</i>  <i>Jablana</i>	<i>Rosaceae</i>  (Rožnice)	Evropa	K: glavna korenina s stranskimi S: olesenelo, mlade veje so pogosto trnaste L: so enostavni, na robu narezani, precej usnjati, spodnja stran je kosmata, listni pecelj je kratek, listi imajo 8-16 izstopajočih žil C: so dvospolni, peterosomerni, znotraj običajno beli, zunaj rahlo rožnati. Imajo 15-50 prašnikov z rumenimi prašnicami. P: jabolko
Sliva	<i>Prunus domestica</i>	<i>Rosaceae</i>	Azija, Japonska,	K: glavna korenina s stranskimi

		(Rožnice)	Evropa	S: olesenelo L: enostavni, premenjalno razporejeni C: beli ali rožnati, posamezno ali več cvetov skupaj P: sliva
Grozdje	<i>Vitis vinifera</i>  <i>Vinska trta</i>	<i>Vitaceae</i>  (Vinikovke)	Evropa	K: glavna korenina s stranskimi S: olesenelo, konča se z viticami L: trojno nacepljeni, zelo veliki, deljeni listi C: zelenkasti P: jagoda
Endivija	<i>Cichorium</i> <i>endivia</i>	<i>Asteraceae</i> (Nebinovke)	Južna Azija, Evropa, Azija, Kitajska	K: glavna korenina s stranskimi S: / L: mehki, čvrsti, zunanji listi so temno do svetlo zeleni, nežnejši in mehkejši, notranji kremasto rumeni C: / P: /
Jedilna buča ali tikva	<i>Curcubita pepo</i> <i>L.</i>	<i>Curcubiaceae</i>  (Bučevke)	Evropa, Amerika, Mehika	K: glavna korenina s stranskimi S: poleglo steblo L: veliki listi C: ženski (ima pod cvetom tenek izrastek) in moški cvet P: so čebulasti, gladki ali

				nagubani, različnih barv
Blitva	<i>Beta vulgaris</i> <i>subsp. vulgaris</i> <i>var. vulgaris</i>	<i>Amaranthaceae</i>	Zahodna Evropa, primorske pokrajine	K: glavna korenina s stranskimi S: malo steblo L: široki, mesnati, dolgi, temno zeleni, v glavah, nagubani C: / P: /
Paradižnik	<i>Solanum</i> <i>lycopersicum</i>	<i>Solanaceae</i> (Razhudnikovke)	Južna Amerika, Evropa	K: glavna korenina s stranskimi S: šibko olesenelo steblo, razraslo, oddlačeno L: so dolgi od 10 do 25 cm, z 5-9 lističi z nažaganim robom, dolgimi do 8 cm, oddlačeni C: rumene barve, premer od 1 do 2 cm. P: jagoda »paradižnik«
Krompir	<i>Solanum</i> <i>tuberosum</i>	<i>Solanaceae</i> (Razhudnikovke)	Evropa, Južna Amerika	K: glavna korenina s stranskimi S: gomolj, pokončno, oddlačeno L: oddlačeni C: rumen P: jagoda
Rdeča pesa	<i>Beta vulgaris</i>	<i>Chenopodiaceae</i> (Metlikovke)	Evropa, Azija	K: odebeljena korenina S: dvoletna ali trajna rastlina z listnatimi stebli višine od enega do dveh

				<p>metrov</p> <p>L: so oblikovani srčasto, pri divjih rastlinah dolgi 5–20 cm (pri gojenih navadno mnogo večji)</p> <p>C: se oblikujejo po dva do pet skupaj, so zelo drobni, premera 3–5 mm, zeleni ali rdečega odtenka in imajo pet cvetnih listov; oprahuje jih veter</p> <p>P: je klobčič trdih oreškov</p>
Korenje	<i>Daucus carota</i>	<i>Apiaceae</i> (Kobulnice)	Evropa	<p>K: velika oranžna odebeljena korenina</p> <p>S: /</p> <p>L: šopasti, do 50 cm visoki</p> <p>P: /</p> <p>C: /</p>
Redkev	<i>Raphanus sativus</i>	<i>Brassicaceae</i> (Križnice)	Evropa	<p>K: koren</p> <p>S: /</p> <p>L: /</p> <p>C: /</p> <p>P: /</p>
Koleraba	<i>Brassica napus</i> <i>var</i> <i>napobrassica</i>	<i>Brassicaceae</i> (Križnice)	Evropa	<p>K: /</p> <p>S: belo odebeljeno steblo</p> <p>L: /</p> <p>C: /</p> <p>P: /</p>
Zeleno zelje	<i>Brassica oleracea</i>	<i>Brassicaceae</i> (Križnice)	Evropa	<p>K: glavna korenina s stranskimi</p> <p>L: zelenobelega barve, čvrsti</p> <p>S: /</p> <p>C: /</p>

				P: /
Rdeče zelje	<i>Brassica oleracea</i>	<i>Brassicaceae</i> (Križnice)	Evropa	K: / S: / L: rdečebele barve, čvrsti; je temno- ali svetlozeleno, modrozeleno ali rdeče ter gladko ali nagubano. Zelnate glave so okrogle ali sploščene. C: / P: /

Tabela 1: Pregled osnovnih uporabljenih vzorcev, njihovih družin, nahajališč in opisov (korenin – K, stebel – S, listov – L, cvetov – C in plodov – P) [16, 17]

### 3.5 HIPOTEZA

Predpostavljamo, da je možno z uporabo komercialnega in okolju sprejemljivega postopka ustrezno izolirati serijo vzorcev in pripraviti tako imenovano knjižnico izolirane DNA. Vsebnosti DNA v vzorcih so različne, zato predpostavljamo, da nam bo izhodni postopek omogočal omenjeno opazovanje. Metodo bomo najprej optimizirali na modelnih vzorcih sadja in zelenjave in opazovali količino izolirane DNA. S pomočjo ustreznih načinov odpiranja celic bomo v nadaljevanju lahko opazovali vsebnost sproščene DNA iz vzorca. Predvidevamo, da je mehanski način z uporabo preprostih aparatov bistveno učinkovitejši kot trenje vzorca v terlinici.

V nadaljevanju trdimo tudi, da je možno uporabiti omenjeno metodo za izolacijo DNA iz bioloških odpadkov (predvsem izločkov živalskega izvora).

## 4. EKSPERIMENTALNI DEL



## **4.1 UVOD K EKSPERIMENTOM**

Pridobivanje DNA iz ekološkega in biološkega okolja je preprost poskus, ki ga lahko izvajamo v osnovnih in srednjih šolah. Pri procesu izolacije opazujemo ločevanje nitk DNA od preostale izolacijske mešanice. Barva in vonj sta odvisna od uporabljenega reagenta in vrste vzorca, ki ga vključimo v eksperiment. Pridobivanje DNA z enakim postopkom, kot smo ga izvedli, lahko vključimo v vsebine naravoslovja, predvsem biokemije, biologije in medicine.

Pred samim začetkom dela smo očistili delovne površine. Pri izvedbi same izolacije pazimo na natančnost izvedbe, veliko pozornosti pa namenimo osebni varovalni opremi. Kljub uporabi okolju prijaznih reagentov in predvsem vzorcev nosimo zaščitna sredstva in s tem poskrbimo za lastno varnost.

## **4.2 UPORABLJENI INVENTAR**

- tehtnica EB 6000D – Železniki (Jugoslavija),
- multipraktik MCM2100 – Bosch,
- hladilnik Gorenje RB4061AW367180
- merilni valj, 200 mL, 5 kom.
- čaša, 500 mL, 2 kom.
- laboratorijsko stojalo, 2 kom.
- filtrimi obroč, 2 kom.
- steklena palčka, 2 kom.
- petrijevke,
- lij ločnik, 2 kom.
- cedilo, 2 kom.
- merilni valj, 10 mL, 2 kom.
- čaša, 50 mL, 3 kom.
- kapalke, 5 kom.
- terilnica s pestilom, 2 kom.
- ura Star quartz,
- optični mikroskop OPTI ST 30 C 2 L,
- opti-flex kamera,

- fotoaparati Olympus X-43.

### **4.3 REAGENTI IN RAZTOPINE**

- 100 g vzorca (banana, jabolko, solata, zeleno zelje, jedilna bučka, blitva, grozdje, paprika, paradižnik, sliva, korenje, solata – endivija, buča, krompir, pesa, redkev, rdeče zelje, koleraba, konjski iztrebki),
- tekočina za kontaktne leče (biotru – Bausch + Lomb USA),
- detergent (Pril power 3 action gel lemon – Henkel),
- sol (NaCl),
- 96 % etanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH),
- destilirana voda,
- kremenčev pesek (silicijev dioksid, SiO<sub>2</sub>).

### **4.4 MODELNI REALNI VZORCI**

Kot je bilo že omenjeno, smo uporabljali vzorce, ki so bili prisotni na domačih vrtovih in njivah, nekaj je bilo kupljenih v komercialni trgovini. Veliko število živil smo izbrali zato, ker želimo določiti razliko prisotnosti DNA v različnih vrstah sadja in zelenjave.

Za utemeljitev in dokaz, da je izbrana metoda izolacije DNA primerna tudi za druge vrste vzorcev, smo eksperiment izvedli tudi s konjskimi iztrebki konja pasme *Norik*.

## **4.5 OPIS POSTOPKOV IZOLACIJE DNA**

### **4.5.1 SPLOŠEN POSTOPEK IZOLACIJE DNA**

100 g živila, ki je vir DNA, 0,2 g NaCl in 200 mL vode smo mehansko obdelali v multipraktiku pri najvišji hitrosti (15 sekund). Raztopino smo skozi cedilo precedili v stekleno čašo. Filtrirni raztopini smo s kapalko dodali 1 mL tekočega detergenta za pomivanje posode, dobro premešali in zmes pustili stati 15 minut.

Vsebino mešanice smo nato prelili v stekleno čašo, in sicer do 1/3 visoko, slednji smo dodali 0,2 mL tekočine za leče. Pojavita se dve plasti. Zgornja plast, ki je prišla v stik z dodano tekočino za leče, se strdi, zato smo močno, a previdno premešali, da so skupki trdnih delcev izginili.

Čašo smo previdno nagnili in s kapalko počasi, po kapljicah dolivali 96 % etanol. Celotna količina dodanega etanola je bila enaka že prisotni vsebini v čaši. DNA se je po 10 minutah, v obliki belih nitk, dvignila v zgornjo, alkoholno plast. Fazi v mešanici ločimo v liju ločniku. Zgornjo plast, v kateri se je sprostila DNA, posušimo in stehtamo.

### **4.5.2 IZOLACIJA DNA S TERMOSTATIRANJEM**

Postopek dela izvedemo povsem identično, kot je opisano pod 4.5.1. Omenimo le, da smo vzorčni mešanici dodali po mehanski obdelavi 200 mL vode in vsebino segrevali 40 min na vrelišču vode (100 °C). Vzorčno mešanico smo ohladili v kopeli na 30 °C.

Izvedemo primerjalni študiji. Prvi del vzorca postavimo v hladilnik za 16 ur na temperaturo 2 °C; ker je izolacijska mešanica v celoti zmrznila, smo jo odtalili in nadaljevali splošni postopek izolacije. Pri drugem delu pa sledi po ohlajanju na 30 °C takojšnja izolacija (nadaljevanje z dodatkom detergenta).

#### **4.5.3 IZOLACIJA DNA Z UPORABO KREMENČEVEGA PESKA**

100 g živila, ki je vir DNA, smo s pestilom v terilnici zdrobili na manjše komponente. Medtem ko smo vzorec živila trli, smo po porcijah dodajali kremenčev pesek ( $\text{SiO}_2$ ). Vsebino smo prenesli v večjo čašo, dodali 200 mL vode, 0,2 g natrijevega klorida ter postopek nadaljevali po principu, ki je opisan pod točko 4.5.1.

#### **4.5.4 IZOLACIJA DNA IZ KONJSKEGA IZTREBKA**

Postopek izolacije je povsem identičen, kot je opisano pod točko 4.5.1, le da zatehtamo 100 g svežega konjskega iztrebka.

## 5. REZULTATI IN DISKUSIJA

## 5.1 OPAŽANJA

Izolacija DNA ne uspe pri vsakem poskusu, zato je dobro poskus nastaviti v več čaš in pozorno gledati, v kateri čaši se začnejo dvigati tanke bele nitke. Po določenem času se v alkoholno plast dvigne tudi del spodnje plasti, ki ne glede na čiščenje vsebuje še veliko komponent vzorca, kot so proteini in podobno. Situacija nastopi predvsem zato, ker so detergenti in ostali reagenti manj učinkoviti kot kemijski reagenti, ki jih uporabljajo v laboratorijih, specializiranih za izolacijo DNA.

Celotna izolacija DNA iz posameznega vzorca se konča približno v 25 minutah, kar je šolskemu okviru naklonjeno. V šolah bi se postopek splošno lahko uporabljal tudi z drugega zornega kota, saj pri delu uporabimo le osnovne, komercialno dostopne reagente. Pri demonstraciji v razredu smo postopek izolacije umestili v pouk biologije pod področje celice, in sicer med celične organele, jedro in dedni material – DNA.

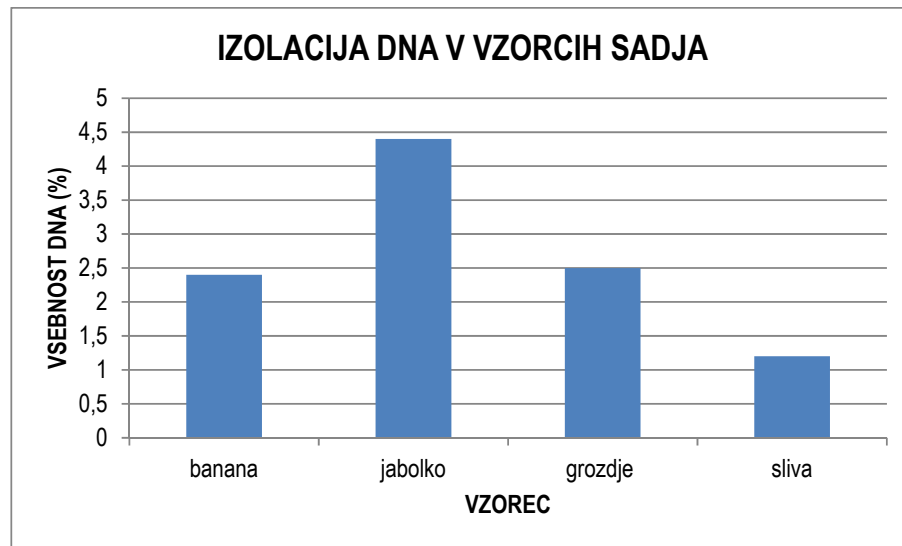
## 5.2 REZULTATI MERITEV

### 5.2.1 SPLOŠEN POSTOPEK IZOLACIJE DNA

#### **PREGLED IZOLIRANE DNA V VZORCIH SADJA**

SADJE (100 g)	VRSTA	POREKLO	m (DNA) [g]	w (DNA)	% DNA
BANANA	KULTIVAR DWARF CAWENDISH	EKVADOR	2,4	0,024	2,4
JABOLKO	JONATAN	SLOVENIJA	4,5	0,045	4,5
GROZDJE	KVINTON	SLOVENIJA	2,5	0,025	2,5
SLIVA	DUO SLIVA	SLOVENIJA	1,2	0,012	1,2

Tabela 2: Prikaz uporabljenih sadežev, vrste, porekla, mase in deleža izolirane DNA



Graf 1: Pregled deleža vsebnosti DNA v vzorcih sadja

Ugotovili smo, da je pri sadju vsebnost DNA največja v jabolku (4,4 %) in najmanjša pri slivi (1,2 %). Banana in grozdje sta dosegala srednjo vsebnost DNA.



Slika 7: Ločevanje zmesi pri vzorcu grozdja



Slika 8: Ločevanje zmesi pri vzorcu banane



Slika 9: Uporabljeni reagenti in kemikalije za izolacijo



Slika 10: DNA vijačnica jabolka pod mikroskopom (40-kratna povečava)

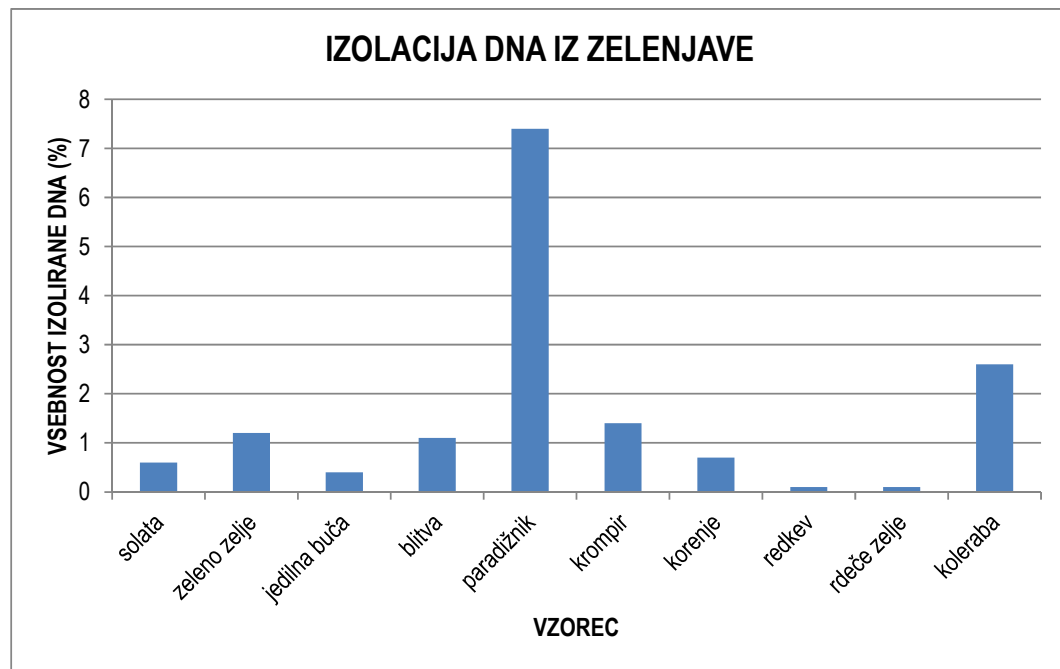
### **PREGLED IZOLIRANE DNA V VZORCIH ZELENJAVE**

<b>ZELENJAVA (100 g)</b>	<b>POREKLO</b>	<b>VRSTA</b>	<b>m (DNA) [g]</b>	<b>w (DNA)</b>	<b>% DNA</b>
SOLATA	SLOVENIJA	ENDIVIJA	0,6	0,006	0,6
ZELENO ZELJE	SLOVENIJA	VARAŽDINSKO ZELJE	1,2	0,012	1,2
JEDILNA BUČA	SLOVENIJA	COKINI	0,4	0,004	0,4
BLITVA	SLOVENIJA	STEBELNA BLITVA	1,1	0,011	1,1



PARADIŽNIK	SLOVENIJA	PARADIŽNIK LUŠT	7,4	0,074	7,4
KROMPIR	SLOVENIJA	IGOR	1,4	0,014	1,4
KORENJE	SLOVENIJA	GUERANDE	0,7	0,007	0,7
REDKEV	SLOVENIJA	ČRNA REDKEV	0,1	0,001	0,1
RDEČE ZELJE	SLOVENIJA	RDEČE ZELJE ERFURTSKO RANO	0,1	0,001	0,1
KOLERABA	SLOVENIJA	HOFMANOVA RUMENA KOLERABA	2,6	0,026	2,6

Tabela 3: Pregled izolirane DNA v vzorcih zelenjave



Graf 2: Pregled vsebnosti izolirane DNA v vzorcih zelenjave

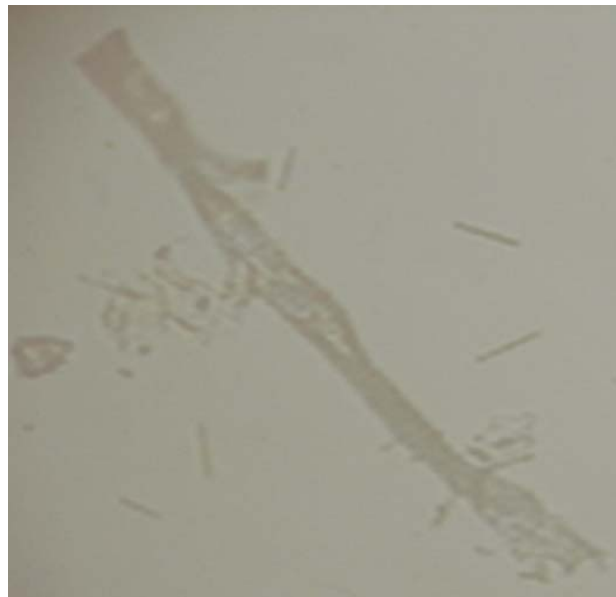
Iz grafa je razvidno, da je največja vsebnost izolirane DNA pri paradižniku (7,4 %), sledijo koleraba (2,6 %), krompir (1,4 %), zeleno zelje (1,2 %), blitva (1,1 %), korenje (0,7 %), solata (0,6 %), jedilna buča (0,4 %). Med zelenjavo z najmanjšo vsebnostjo DNA štejemo redkev in rdeče zelje z enako vsebnostjo – 0,1 %.



Slika 11: Izolacija DNA iz rdečega zelja



Slika 12: Vijačnica DNA v vzorcu kolerabe (40-kratna povečava)

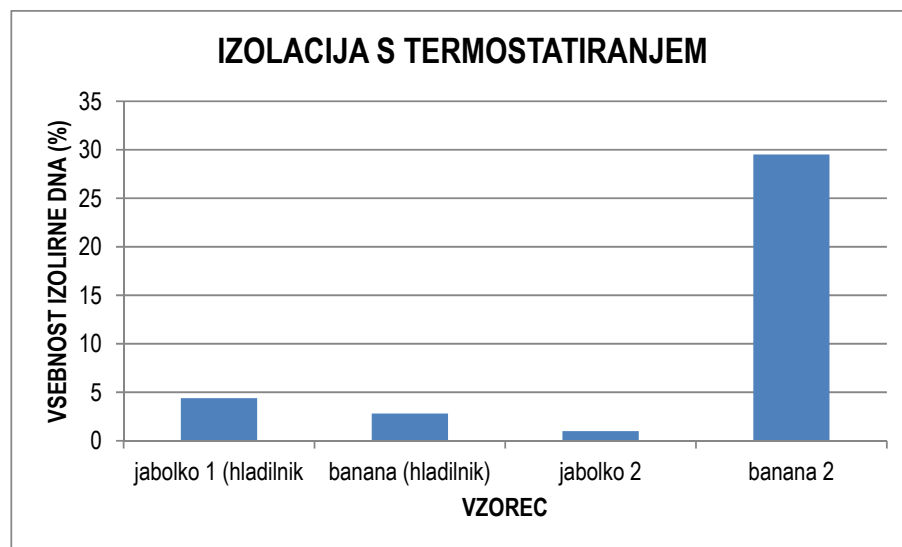


Slika 13: DNA vzorca kolerabe pod mikroskopom na 100-kratni povečavi

### 5.2.2 IZOLACIJA DNA S TERMOSTATIRANJEM

VZOREC (100 g)	POREKLO	VRSTA	m (DNA) [g]	w (DNA)	% DNA
JABOLKO 1 (HLADILNIK)	SLOVENIJA	JONATAN	4,4	0,044	4,4
BANANA 1 (HLADILNIK)	EKVADOR	KULTIVAR DWARF CAWENDISH	2,8	0,028	2,8
JABOLKO 2	SLOVENIJA	JONATAN	1,0	0,010	1,0
BANANA 2	EKVADOR	KULTIVAR DWARF CAWENDISH	29,5	0,295	29,5

Tabela 4: Pregled izolirane DNA v termostatiranih vzorcih, segreto sadje z ohlajanjem v hladilniku (1) in brez ohlajanja v hladilniku (2)



Graf 3: Pregled vsebnosti izolirane DNA s prehodno termostatirno obdelavo

Izolacijo smo izvedli na dveh modelnih vzorcih – banani in jabolku, in sicer v dveh ločenih paralelkah. Najprej smo v vodi jabolko in banano ločeno segrevali na vrelišče vode, ohladili in nato postavili za 16 ur v hladilnik na temperaturo 2 °C. Sledila je splošna izolacija, kot omenjamo že v točki 4.5.1. Drugi paralelki

vzorcev smo v vodi segrevali do vrelišča, ohladili in takoj izolirali po klasični recepturi. Ugotovili smo, da je vsebnost DNA pri uporabljeni banani višja, če vzorca ne postavimo dodatno v hladilnik (vsebnost DNA znaša 29,5 %). Jabolko pa jasno nakazuje boljši rezultat, če vzorec še dodatno termostatiramo dlje časa v hladilniku na konstantni temperaturi (2 °C); vsebnost DNA je v tem primeru znašala 4,4 %.



Slika 14: Ločevanje zmesi pri vzorcu kuhane banane

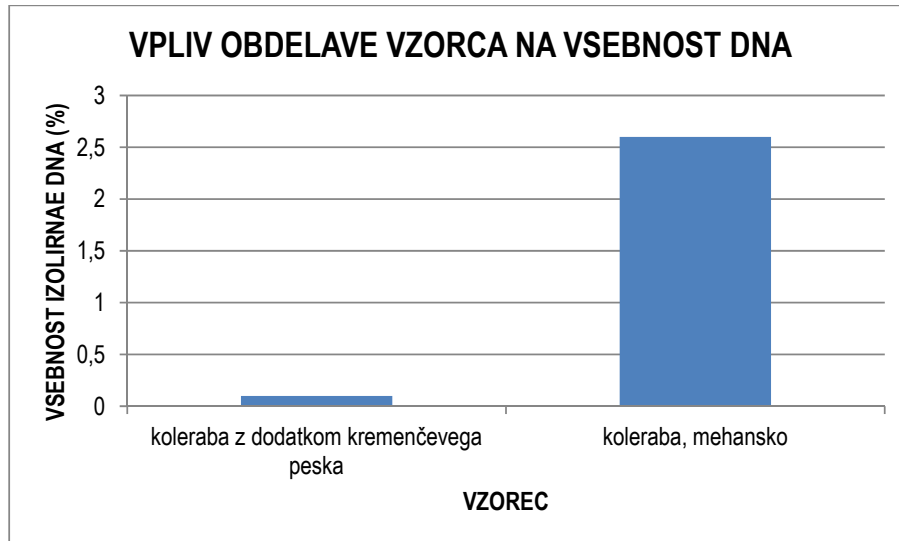
### 5.2.3 IZOLACIJA DNA Z UPORABO KREMENČEVEGA PESKA

Predhodno homogenizacijo in razbijanje celic z uporabo kremenčevega peska namesto mehanske naprave smo izvedli na modelnem vzorcu zelenjave (koleraba) in sadja (grozdje).

VZOREC (100 g)	POREKLO	VRSTA	m (DNA) [g]	w (DNA)	% DNA
KOLERABA	SLOVENIJA	HOFMANOVA RUMENA KOLERABA	0,1	0,001	0,1

Tabela 5: Opis vzorca kolerabe in vsebnost izolirane DNA v njem

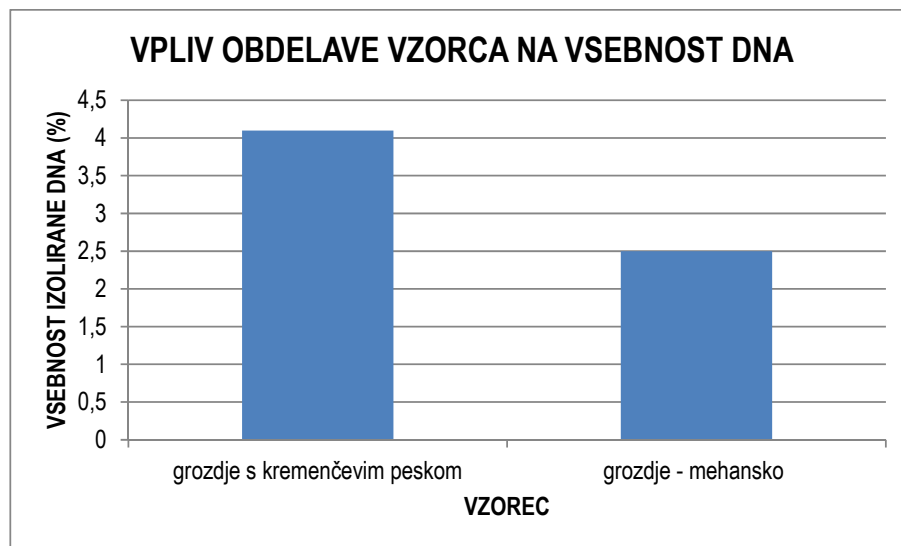
Ker so bile pri mehanskem postopku kolerabe vijačnice DNA zelo dobro vidne, smo poskus izvedli še ročno – s trenjem vzorca v terilnici z uporabo kremenčevega peska ( $\text{SiO}_2$ ). Rezultati v grafu pokažejo, da je mehanska obdelava vzorca boljša, kar za nadaljnje študije bolj priporočamo.



Graf 4: Primerjalni pregled vsebnosti DNA glede na mehansko in fizično obdelavo vzorca kolerabe

VZOREC (100 g)	POREKLO	VRSTA	m (DNA) [g]	w (DNA)	% DNA
GROZDJE	SLOVENIJA	KVINTON	4,1	0,041	4,1

Tabela 6: Pregled izolirane DNA v grozdju s kremenčevim peskom



Graf 5: Primerjalni pregled vsebnosti DNA glede na mehansko in fizično obdelavo vzorca grozdja

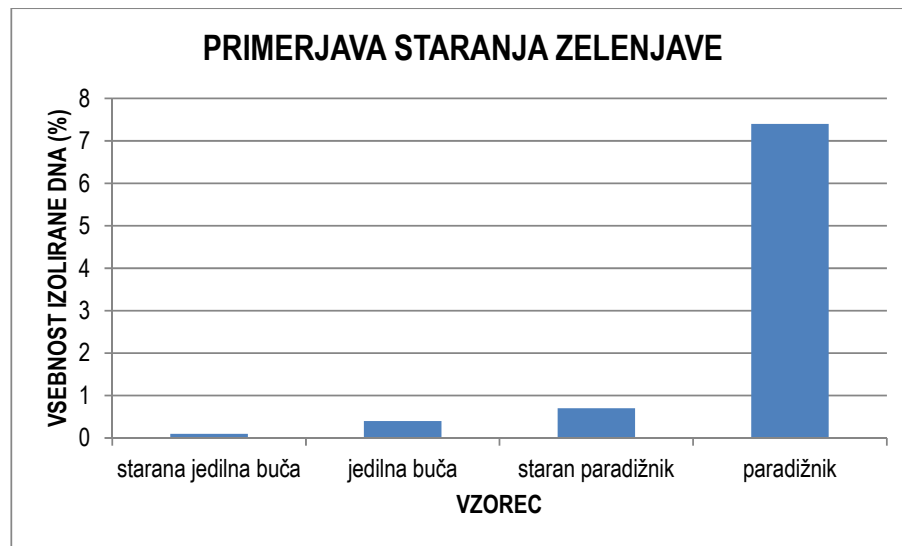
Vzorcju grozdja s trenjem v terilnici povečamo vsebnost DNA. Metodo s trenjem priporočamo za nekatere vzorce, ki imajo bolj krhko celično steno, da se njena vsebina lažje sprosti. Mehanski način priprave vzorca nam omogoča, da pridobimo 2,5 % DNA, fizično trenje v terilnici pa kar 4,1 %.

#### 5.2.4 IZOLACIJA DNA IZ STARANIH VZORCEV

Ker nas je zanimalo, kako je z vsebnostjo DNA pri vzorcih, če jih pustimo starati določen čas, smo izvedli študijo, v katero smo vključili vzorce, ki so bili stari 3 tedne. Izolacijo DNA smo izvedli po klasičnem postopku, kot smo ga že navedli.

VZOREC (100 g)	POREKLO	VRSTA	m (DNA) [g]	w (DNA)	% DNA
JEDILNA BUČA	SLOVENIJA	COKINI	0,1	0,001	0,1
PARADIŽNIK	SLOVENIJA	PARADIŽNIK LUŠT	0,7	0,007	0,7

Tabela 7: Pregled izolirane DNA v vzorcih starane zelenjave



Graf 6: Primerjava vsebnosti izolirane DNA v vzorcih starane zelenjave

Ugotovljeno je bilo, da je vsebnost DNA pri staranih vzorcih precej nizka. Najnižjo vsebnost DNA ima jedilna buča (0,1 %), kateri sledi paradižnik z 0,7 %. V primerjavi z njima imata klasična – sveža vzorca srednjo raven vsebnosti. Živila, ki se starajo, počasi razpadajo, s tem tudi DNA, kar utemeljuje še dodatni dokaz.



Slika 15: Ločevanje izolacijske mešanice v zmesi pri staranem paradižniku

### 5.2.5 IZOLACIJA DNA IZ KONJSKEGA IZTREBKA

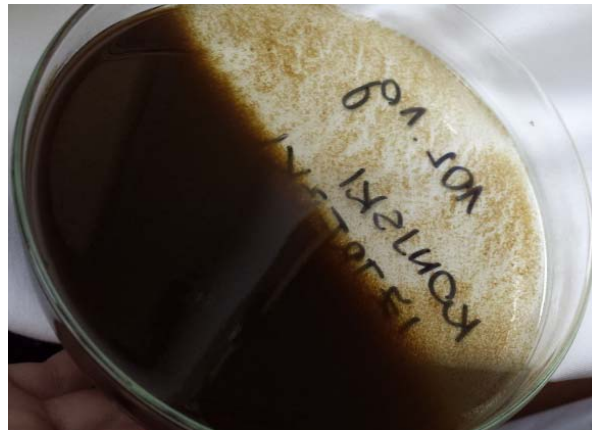
VZOREC (100 g)	POREKLO	VRSTA	m (DNA) [g]	w (DNA)	% DNA
KONJSKI IZTREBEK	SLOVENIJA	ČISTOKRVNI NORIK	1,9	0,019	1,9

Tabela 8: Pregled izolirane DNA v vzorcu konjskega iztrebka

Konj, katerega iztrebek smo vzeli, se je prehranjeval z rastlinsko hrano. Ugotovili smo, da je pri poskusu pridobivanja DNA na 100 g konjskega iztrebka masa DNA sorazmerno visoka. Vir DNA, ki jo je vseboval vzorec iztrebka, je predvsem prehranskega izvora in iz določenih komponent, ki se nahajajo v konjevem telesu in jih izloči.



Slika 16: Ločevanje zmesi konjskega iztrebka



Slika 17: DNA konjskega iztrebka



## 6. ZAKLJUČEK

Pred začetkom dela smo si zastavili glavno hipotezo, ki nas je kot misel vodila skozi celotno delo. Hipotezo lahko v celotnem kontekstu potrdimo. Uspešno smo raziskali in ovrednotili postopek za izolacijo DNA iz bioloških in ekoloških vzorcev. Metoda svojo aplikativno vrednost doseže na področju kemijskega in biološkega izobraževanja, na osnovno- in srednješolski ravni. Učencem in dijakom z eksperimenti prikažemo, kako pridobiti DNA na hiter, enostaven in ekonomsko ter ekološko sprejemljiv način. Dandanes je potrebno pogledati tudi na cenovno strategijo eksperimenta, kar je bil tudi naš osnovni motiv dela. Izolirana DNA, pridobljena pri tovrstnem postopku, v določenih primerih močno odstopa od realnih mišljenj. Dejstvo je, da je potrebno izbrano metodo testirati vzporedno še z različnimi tehnikami in pogledati detajle (primerjave). Rezultati, ki nam jih je nudil eksperiment, so postopku primerni. V nadaljevanju želimo znanje na tem področju še poglobiti in analizirati izolirano DNA še z uporabo spektroskopskih tehnik. Spektroskopske tehnike v našem ciklusu izobraževanja niso primerne, saj zahtevajo večjo širino. Po pregledu literature in idej bomo v nadaljevanju izoliranim vzorcem posneli absorpcijski maksimum pri določeni valovni dolžini, ki je specifična za DNA, in pri valovni dolžini, ki ustreza proteinom. S primerjavo bomo določili, ali je naš vzorec v večini vseboval DNA ali proteine, ki so se sprostili po obdelavi vzorca (mehansko oz. fizično). S tega zornega kota bomo lahko najhitreje z gotovostjo ovrednotili lastnosti izbrane metode. Delo v prvi stopnji smo opravili, izolacija je uspela. Prva karakterizacija pridobljene DNA je uspešno dokazala njen nastanek. Ta karakteristična tehnika je bila pretežno kvalitativne osnove in temelji na opazovanju in mikroskopiji. Kot del rezultatov smo v raziskovalno delo uvedli še izračun % izolacije DNA glede na začetno količino vzorca.

Pokazali smo, da je možno s preprostim poskusom analizirati vzorce sadja, zelenjave in realnih bioloških izločkov. Hipotezo smo v nadaljevanju samega dela še razširili in opazovali vpliv zunanjih pogojev na izolacijo. Vzorci, ki so vsebovali večjo količino nastale DNA, so po večini vsebovali v celični notranjosti bolj krhke stene, tako da se je vsebina lahko v večjem deležu sprostila. Z načinom termostatiranja smo pokazali, da pri višjih temperaturah snovi razpadajo, tako je tudi z DNA. Tudi DNA ima na nekem temperaturnem intervalu svojo optimalno delovanje. Pri ekstremnih pogojih se tudi ta uniči oz. razpade.

Metodo smo kot končni rezultat aplikacije preizkusili na realnem življenjskem primeru – iztrebkih konja, kar nam je predstavljalo velik izziv. V laboratoriju so se širile neprijetne vonjave, vse dokler nismo dodali ustreznih reagentov, potem pa je vonj izginil. Nevtralizacijo vonja so povzročili sol, detergent in tekočina za leče, ki smo jih dodajali med samo izolacijo. Vsebnost DNA v iztrebkih živih bitij je odvisna predvsem od zasnove organizma, prehranjevalnih navad in starosti vzorca. Obstaja še več možnosti, ki pa jih v takem

okolju ne moremo nadzorovati hkrati. Vzorec, ki smo ga uporabili, je bil svežega izvora, kar pomeni, da smo pred odvzemom izključili vpliv dodatnih organizmov, ki prihajajo nanj.

Zemlja je le ena in za enkrat je življenje mogoče le tukaj. Kako dolgo bo, če ne bomo iskali okolju prijaznih rešitev za postopke, ki so potrebni in nas vsakodnevno spremljajo? To je le ena izmed malenkosti, ki močno vplivajo na onesnaževanje Zemlje, vendar če odpravimo to, smo bližje čistejšemu in za življenje prijaznejšemu planetu. Skrb za okolje in lastno varnost v življenjskem prostoru naj bo skrb slehernega posameznika, obenem pa mora upoštevati še ekonomičnost in tako skrbeti za boljši jutri.

## 7. LITERATURA

- [1] Stockley, C, Slikovni pojmovnik– Biologija, Tehniška založba Slovenije, Ljubljana, 1991.
- [2] Dolenc, S., Kvarkadabra – časopis za tolmačenje znanosti [online]. Dostopno na URL naslovu: <http://www.kvarkadabra.net/staticpages/index.php/slovar2> [Citirano 16.02.2014, 18.00].
- [3] Svečko, M., Gorjan, A., Spoznavam živi svet, DZS, Ljubljana, 2013.
- [4] Claybourne A., Geni in DNK, Tehniška založba Slovenije, Ljubljana, 2004.
- [5] Kromosom, kromatidi. Dostopno na URL naslovu: [http://1.bp.blogspot.com/\\_W8CnB6T2vbM/Ssx5Jy6IKI/AAAAAAAAA28/nSeF-MbVPJM/s1600-h/A4.jpg](http://1.bp.blogspot.com/_W8CnB6T2vbM/Ssx5Jy6IKI/AAAAAAAAA28/nSeF-MbVPJM/s1600-h/A4.jpg) [Citirano 16.02.2014, 18.05]
- [6] Horvatič, M., Vampel, A., Primerjava različnih postopkov izolacije DNA, Projektna naloga, Ljubljana, 2013.
- [7] Grabnar, M., Novak, T., Biologija 7 in 8, Genetika in evolucija, DZS, Ljubljana, 1997.
- [8] Hedl, A. Uporaba genetike v forenzični medicini. *Seminarska naloga*, Maribor, 2011.
- [9] Uredniki Greenpeace [online]. Dostopno na URL naslovu: <http://www.greenpeace.org/slovenia/si/kaj-delamo/reci-ne-genetskemu-in-eniringu/> [Citirano 16.02.2014, 18.10]
- [10] Van der Baan, K., Vrednotenje novih vaj iz biokemije za študente dvopredmetnih programov biologija z vezavami, *Diplomsko delo*, Univerza v Ljubljani, Pedagoška fakulteta, Biotehniška fakulteta, Ljubljana, 2007.
- [11] Ugarković, Đ., Centromere [online]. Dostopno na URL naslovu: [http://bmb.pharma.hr/predavanja/organizacija\\_genoma\\_files/slide0188\\_image094.jpg](http://bmb.pharma.hr/predavanja/organizacija_genoma_files/slide0188_image094.jpg)  
<http://www.greenpeace.org/slovenia/si/> [Citirano 16.02.2014, 18.15]
- [12] Milanović, M., Covek u krugu sunca i meseca [online]. Dostopno na URL naslovu: [http://milan.milanovic.org/math/srpski/covek/Covek\\_files/i](http://milan.milanovic.org/math/srpski/covek/Covek_files/i) [Citirano 16.02.2014, 18.20]

[13] Skelet DNA [online]. Dostopno na URL naslovu:

<http://www.znanje.org/i/i21/01iv11/01iv1129/image4.jpg> [Citirano 16.02.2014, 18.25]

[14] Molekula RNA [online]. Dostopno na URL naslovu:

[http://mss.svarog.si/biologija/MSS/econtent/multimedia/60/11072/01\\_genetika\\_molekularna\\_genski\\_kod\\_rna\\_pripisana.jpg](http://mss.svarog.si/biologija/MSS/econtent/multimedia/60/11072/01_genetika_molekularna_genski_kod_rna_pripisana.jpg) [Citirano 16.02.2014, 18.35]


[15] Lanzara, P., Pizzetti, M., Drevesa, Mladinska knjiga, Ljubljana, 1984.

[16] Aspen, J., Royal Horticultural Society (London), Enciklopedija vrtnarjenja Kraljevo hortikulturno združenje (London), Slovenska knjiga, Ljubljana, 1998.

[17] Hribernik, M., Izolacija DNK iz sadja in zelenjave, *Raziskovalna naloga*, Celje, 2013.

## 8. DODATEK

### 8.1 VARNOSTNA OPOZORILA KEMIKALIJ

Ime kemikalije	Formula	M (g/mol)	Piktogram	H-stavki	P-stavki	CAS
natrijev klorid	NaCl	58,44	/	/	/	7647-14-5
96 % etanol	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	46,07		H225	P210	64-17-5
silicijev dioksid	SiO <sub>2</sub>	60,09	/	/	/	7631-86-9

### 8.2 PRIMER IZRAČUNA MASNEGA DELEŽA DNA V VZORCU

***Izpis podatkov:***

m (živila) = 100 g

m (DNA) = 0,7 g

***Računanje masnega deleža vzorca:***

w(DNA) = m (izolirane DNA) : m (celote živila) = 0,7 g : 100 g = 0,007

***Masni odstotek:***

0,007 · 100 = 0,7 %