

# Izolace DNA

## Cíle:

Žák izoluje DNA z různých biologických materiálů.

Žák vysvětlí princip izolace DNA na základě znalosti umístění a vlastností DNA.

Žák analyzuje možnosti využití znalostí z oblasti genetiky v běžném životě

## Zařazení v rámci RVP G:

**Člověk a příroda:** předvídání průběhu studovaných přírodních procesů na základě znalosti obecných přírodovědných zákonů a specifických podmínek

**Biologie:** molekulární a buněčné základy dědičnosti - analyzuje možnosti využití znalostí z oblasti genetiky v běžném životě

**Chemie:** nukleové kyseliny - objasní strukturu a funkci sloučenin nezbytných pro důležité chemické procesy probíhající v organismech  
detergenty

## Opěrné pojmy:

DNA, detergenty, filtrace, precipitace

## Materiál:

- šampon obsahující EDTA (ethylene diamine tetraacetic acid) nebo jar
- kuchyňská sůl
- destilovaná voda (možno i z kohoutku, pokud není příliš tvrdá)
- banán, kiwi, paprika, slezina,... – čerstvé, ne moc zralé (v přezrálém ovoci už může být DNA naštěpena a pak nepůjde namotat na tyčinku)
- filtrační papír (papírový kapesník)
- podchlazený líh (možno denaturovaný) - na teplotu okolo 0°C
- odměrný válec a váhy (není třeba přesně odměřovat uvedená složek množství, ale je možné, že se tím výrazně sníží viditelnost výsledku)
- kádinky, zkumavky, třecí misky, píšek a libovolné nástroje na rozmělnění biologického materiálu a manipulaci s roztoky
- NaOH
- difenylaminové činidlo: v 10 ml ledové kyseliny octové se rozpustí difenylamin a pak se přidá  $2 \times 7,5$  ml koncentrované kyseliny sírové

## Postup pokusu:

- 1 g přírodního materiálu rozmělníme na kašovitou hmotu.
- Přilijeme 30 ml vody s rozpuštěnými 0.1 g soli a 5-10 ml šamponu.
- Vzniklou směs promícháme a necháme 5-10 minut odstát.
- Následně přefiltrujeme přes papírový kapesník.
- Filtrát rozlijeme do zkumavek (či jiných nádob) tak, aby výška ode dna činila asi 1 cm (cca 1 ml v případě zkumavky).
- Do zkumavek nalijeme čtyřnásobek podchlazeného lihu
- Bílá vláknitá sraženina stoupající z dolní „zamlžené“ fáze (filtrát) do horní průhledné fáze (líh) je DNA (obsahující některé jaderné proteiny, případně jiné molekuly podobnými chemickými vlastnostmi jako DNA).
- Necháme 10 min odstát

- Ve zkumavce pomalými jemnými pohyby kroužíme skleněnou tyčinkou – DNA se namotá na tyčinku, kdežto vysrážené proteiny zůstanou v roztoku.
- Izolovanou DNA přeneseme do 1 ml 0,5% roztoku NaOH a přidáme 1 ml difenylaminového činidla, zahříváme 10-20 minut na vroucí vodní lázni.

### Vysvětlení:

Při izolaci DNA vycházíme z jejího umístění v buňce a jejích chemických vlastností.

DNA je umístěna v jádře buňky, tedy je od okolního prostředí oddělena několika fosfolipidovými membránami. Zde je na ni navázáno množství proteinů. Jedná se o strukturní proteiny, dále o transkripční faktory nebo polymerázy a jejich pomocné proteiny (molekuly aktivně přepisují řetězce DNA).

Po chemické stránce je DNA lineární makromolekula, jejíž dva komplementární řetězce jsou k sobě připoutané vodíkovými můstky. Molekula DNA nese náboj (resp. je to kyselina), takže je rozpustná ve vodě, nicméně může být z vodného roztoku vysrážena (precipitována) ethanolem.

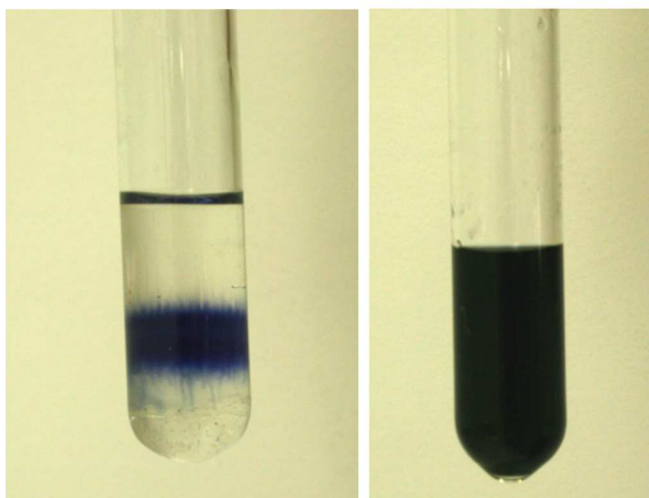
Když do rozmačkaného banánu nalijeme roztok šamponu s EDTA, vodou a solí, sledujeme tím vlastně několik kroků. Detergenty obsažené v šamponu proděraví a vysráží buněčnou membránu banánu a také některé proteiny. EDTA inhibuje proteiny obsahující kovy, z nichž jsou některé schopné poškodit DNA. Sůl se přidává kvůli zachování osmotického tlaku roztoku. 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.

Následnou filtrací se tedy 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. Podchlazený lih se přilévá, protože se za nižší teploty příliš nemísí s vodou. DNA se vysráží (precipituje) a vyplave do horní, lihové fáze. V lihu je nerozpustná. Kdybychom ji převedli z lihu opět do vody, znovu se rozpustí (i když její chemická struktura nebude úplně stejná, jako předtím).

Nutno dodat, že kromě DNA se mohou podobně chovat i některé jiné složky buňky a že se tímto způsobem nezbavíme většiny proteinů vázaných na DNA (např. histonů).

### Důkaz RNA a DNA reakcí s difenylaminovým činidlem

DNA a RNA lze rozlišit na základě barevných reakcí, které poskytují ribosa resp. 2-deoxyribosa s difenylaminem. Difenylamin poskytuje s RNA zelené zbarvení a s DNA modré zbarvení.



Na obrázku vlevo vidíte krásně modré zbarvení – reakce s difenylaminovým činidlem – bez zahřívání

Na obrázku vpravo je DNA s difenylaminovým činidlem po 10 minutách zahřívání na vodní lázni (barva je tak sytě modrá, že na fotce bohužel vypadá až černě)

### úkol:

Jaké vlastnosti má DNA?

Stručně shrňte, jaké bariéry (a jak) musíme překonat, když chceme izolovat DNA?  
Kde se využívá izolace DNA?

### **Literatura:**

Jan Smyčka, Anita Brožková, Kuchařka biologických pokusů, [server.gymnasiumkladno.cz/file/bio\\_kucharka.pdf](http://server.gymnasiumkladno.cz/file/bio_kucharka.pdf)  
<http://www.thenakedscientists.com/HTML/content/kitchenscience/exp/how-to-extract-dna-from-a-kiwi-fruit/>  
<http://www.daveansell.co.uk/?q=node/31>  
<http://www.ulozto.cz/6580012/izolace-dna-z-kiwi-ppt>  
[http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid\\_isbn-80-7080-586-2/pdf/143.pdf](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_isbn-80-7080-586-2/pdf/143.pdf)  
<http://home.zf.jcu.cz/public/departments/kch/didaktika/biochem/>