

**Sada pro získání DNA ze zeleniny/ovoce**  
**Kat. číslo 108.6399****I Obsah**

Vysvětlení _____	strana 2
Materiály _____	strana 2
Časová náročnost _____	strana 3
Příprava na praktické cvičení _____	strana 3
Laboratorní postup _____	strana 4

**II Vysvětlení**

DNA (kyselina deoxyribonukleová) je dědičná informace, která se vyskytuje ve většině organismů. Ačkoliv je DNA v buňce přibližně 10 000krát delší než samotná buňka, zabírá jen 10 % vnitřního prostoru buňky. DNA zaujímá tak málo místa uvnitř buňky proto, že je svinutá a společně s proteiny složená do komplexních jednotek, které se nazývají chromozomy.

Tímto postupem se extrahuje chromozomální DNA z obyčejné cibule. Cibule se nejprve vloží do mixéru, aby se rozdrtily pevné stěny rostlinných buněk. V dalším kroku se rozloží buněčné membrány. Buněčné membrány se skládají z proteinů a tuků. Stejně jako detergent (např. mycí prostředek) rozpustí tuk v pánvi, lze přidáním malého množství detergentu rozpustit také buněčné membrány.

Tento proces destrukce buněk se nazývá lýza. Žáci při tomto postupu použijí horkou vodní lázeň a lyzační roztok (Cell Lysis Solution) na bázi detergentu pro rozklad buněčných membrán cibule. Při rozložení buněčných membrán vyteče obsah buňky ven a vytvoří polévku z DNA, dalších nukleinových kyselin, destruovaných membrán, buněčných proteinů a jiných obsažených látek. Není třeba vytvářet vysoce čistou DNA, protože úkol spočívá v jejím zviditelnění. DNA, kterou žáci izolují z buněčné polévky, proto není čistá a obsahuje celulární proteiny a další frakce buněk. Pro zviditelnění DNA přidají žáci do buněčné polévky roztok pro precipitaci DNA (DNA Precipitation Solution) na bázi alkoholu. Protože DNA není rozpustná v alkoholu, vysráží se (precipituje) a vytvoří „bílé obláčky“ z jemných viskózních vláken. DNA lze navinout na dřevěnou špejli a prozkoumat podrobněji. Tento postup je známý jako navinutí DNA.

Toto praktické cvičení se hodí pro vědecké začátečníky.

### III Materiály

Reagenční systém obsahuje všechna potřebná činidla pro vyčištění chromozomální DNA z cibule pomocí níže uvedeného postupu. Materiály vystačí pro 15 samostatných preparací a slouží výhradně k použití s touto sadou. Carolina Biological Supply Company nenese odpovědnost, pokud tyto materiály použijete k jiným účelům.

#### **Sada obsahuje následující materiály:**

**Pozor:** Všechny materiály lze skladovat při pokojové teplotě.

- Roztok pro lýzu Cell Lysis Solution, 100 ml
- 15 nesterilních zkumavek s rovným dnem, 50 ml
- Roztok pro precipitaci DNA Precipitation Solution, 150 ml
- 15 nesterilních kónických zkumavek, 15 ml
- 17 filtrů
- 15 dřevěných špejlí
- 15 testovacích zkumavek
- Pracovní list pro žáky
- Příručka pro učitele

#### **Materiály, které potřebujete, ale nejsou obsaženy v sadě:**

- Středně velká cibule, žlutá nebo bílá (na 1 preparaci)
- Nůž a prkénko na krájení
- 60 ml vody (na 1 preparaci)
- Mixér [kat. č.: 201.3497]
- Teploměr (pro kontrolu teploty vodní lázně [kat. č.: 200.0334])
- Velká nádoba na vodu (60-65 °C)
- Led

#### **IV Časová náročnost**

Tento postup je velmi jednoduchý. Vyžaduje jen minimální přípravu a dá se provést během jednoho praktického cvičení.

- 30 min.:** Zahřátí vodní lázně na 60-65 °C, ochlazení roztoku pro precipitaci DNA v ledu a příprava žákovských pracovišť  
**40 min.:** Rozmixování cibule na tekutinu a lyzace buněk  
**5 min.:** Extrahování a navinutí DNA

#### **V Příprava praktického cvičení**

Zahřejte velkou nádobu s vodou na teplotu 60-65 °C. Postavte roztok pro precipitaci DNA Precipitation Solution do ledu.

#### **Příprava žákovských pracovišť**

Položte na každé žákovské pracoviště jednu cibuli a jednu kónickou 50ml zkumavku. (Cibuli můžete, pokud chcete, již předem rozdrtit. Pokud to neuděláte, potřebují žáci materiály pro nakrájení cibule). Žáci musí mít přístup k mixéru, aby mohli cibuli rozmělnit. Pomocí kónické 50ml zkumavky mohou žáci odměřit 60 ml vody a přidat je do mixéru k cibuli. Dejte do každé 15ml zkumavky 7 ml roztoku Cell Lysis Solution, zkumavky popište a postavte vždy jednu zkumavku s roztokem na každé žákovské pracoviště. Dejte do každé testovací zkumavky 14 ml roztoku DNA Precipitation Solution, zkumavky popište a postavte vždy jednu zkumavku do ledu na žákovská pracoviště. Na každé pracoviště položte také jeden filtr a jednu dřevěnou špejli.

#### **VI Laboratorní postup**

- Nakrájejte jednu středně velkou cibuli na hrubo a vložte ji do mixéru.
- Přidejte 60 ml vody (jako odměrku můžete použít kónickou 50ml zkumavku).
- Mixujte 30 vteřin nízkou rychlostí, abyste cibuli rozmělnili.
- Mixujte 10 vteřin, aby se ze směsi stala tekutá hmota, chvílku počkejte a zkontrolujte, zda v hmotě nejsou hrubé kousky, v případě potřeby je ještě rozmixujte.
- Předchozí krok dvakrát zopakujte, cibule by nyní měla být v tekutém stavu.
- Nalijte 7 ml cibulové směsi do zkumavky, která již obsahuje 7 ml roztoku Cell Lysis Solution, obsah promíchejte otočením zkumavky. *Netřepejte.*
- Postavte zkumavku na 15 min. do vodní lázně s teplotou 60-65 °C.
- Vložte do 50ml zkumavky filtr, pomalu nalijte lyzovanou cibulovou směs na filtr a nechte filtrovaný materiál (filtrát) překapat do zkumavky.
- Opatrně navrstvěte příslušné množství ledově studeného roztoku DNA Precipitation Solution na filtrát, který se nachází na dně zkumavky.

**Pozor:** DNA nelze navíjet, pokud se roztok DNA Precipitation Solution smíchá s filtrátem. Zkumavku držte mírně nakloněnou a roztok pro precipitaci přidejte tak, aby pomalu stékal na vnitřní straně zkumavky a nekapal přímo do filtrátu.

- Čirý roztok DNA Precipitation Solution se ve směsi separuje nahoře. Čirý růžově zbarvený filtrát se bude nacházet na dně zkumavky a DNA z cibule by měla být na rozmezí mezi roztokem DNA Precipitation Solution a filtrátem. DNA vypadá jako obláček jemných viskózních vláken.
- Naviňte DNA pro podrobnější zkoumání na dřevěnou špejli. Špejli přitom ponořte do zkumavky lehce pod obláček DNA, špejli otáčejte a přitom s ní opatrně pohybujte mezi DNA a růžovým filtrátem na dně zkumavky dopředu a dozadu. Dejte pozor, aby se vrstvy nesmíchaly. DNA by se měla kolem špejle omotat jako nit na cívce.

**Extrakce DNA z cibule****Jméno:** \_\_\_\_\_**Třída:** \_\_\_\_\_**Datum:** \_\_\_\_\_**Úvod**

DNA (kyselina deoxyribonukleová) je dědičná informace, která se vyskytuje ve většině organismů. Ačkoliv je DNA v buňce přibližně 10 000krát delší než samotná buňka, zabírá jen 10 % vnitřního prostoru buňky. DNA zaujímá tak málo místa uvnitř buňky proto, že je svinutá a společně s proteiny složená do komplexních jednotek, které se nazývají chromozomy.

Tímto postupem se extrahuje chromozomální DNA z obyčejné cibule. Cibule se nejprve vloží do mixéru, aby se rozdrtily pevné stěny rostlinných buněk. V dalším kroku se rozloží buněčné membrány. Buněčné membrány se skládají z proteinů a tuků. Stejně jako detergent (např. mycí prostředek) rozpustí tuk v pánvi, lze přidáním malého množství detergentu rozpustit také buněčné membrány.

Při rozložení buněčných membrán vyteče obsah buňky ven a vytvoří polévku z DNA, dalších nukleinových kyselin, destruovaných membrán, buněčných proteinů a jiných obsažených látek. Není třeba vytvářet vysoce čistou DNA, protože úkol spočívá v jejím zviditelnění. DNA, kterou izolujete z buněčné polévky, proto není čistá a obsahuje celulární proteiny a další frakce buněk. Pro zviditelnění DNA přidejte do buněčné polévky roztok pro precipitaci DNA (DNA Precipitation Solution) na bázi alkoholu. Protože DNA není rozpustná v alkoholu, vysráží se (precipituje) a vytvoří „bílé obláčky“ z jemných viskózních vláken. DNA můžete navinout na dřevěnou špejli a prozkoumat podrobněji. Tento postup je známý jako navinutí DNA.

### Návod k provedení pokusu

- ✚ Na hrubo nakrájenou středně velkou cibuli vložte do mixéru.
- ✚ Přidejte 60 ml vody (jako odměrku můžete použít kónickou 50ml zkumavku).
- ✚ Mixujte 30 vteřin nízkou rychlostí, abyste cibuli rozmělnili.
- ✚ Mixujte 10 vteřin, aby se ze směsi stala tekutá hmota, chvílku počkejte a zkontrolujte, zda v hmotě nejsou hrubé kousky, v případě potřeby je ještě rozmixujte.
- ✚ Předchozí krok dvakrát zopakujte, cibule by nyní měla být v tekutém stavu.
- ✚ Nalijte 7 ml cibulové směsi do zkumavky, která již obsahuje 7 ml roztoku Cell Lysis Solution, obsah promíchejte otočením zkumavky. **Netřepajte.**
- ✚ Postavte zkumavku na 15 min. do vodní lázně s teplotou 60-65 °C, je důležité, aby teplota byla vyšší než 60 °C, ale nižší než 70 °C. Teplotu vyšší než 60 °C potřebujete k destrukci enzymů, které rozkládají DNA.
- ✚ Vložte do 50ml zkumavky filtr, pomalu nalijte lyzovanou cibulovou směs na filtr a nechte čirý, růžově zbarvený filtrát (filtrovanou tekutinu) překapat do zkumavky.
- ✚ Opatrně navrstvěte příslušné množství ledově studeného roztoku DNA Precipitation Solution na filtrát, který se nachází na dně zkumavky.

**Pozor:** DNA nelze navíjet, pokud se roztok DNA Precipitation Solution smíchá s filtrátem. Zkumavku držte mírně nakloněnou a roztok pro precipitaci přidejte tak, aby pomalu stékal na vnitřní straně zkumavky a nekapal přímo do filtrátu.

- ✚ Čirý roztok DNA Precipitation Solution se ve směsi separuje nahoře. Čirý, růžově zbarvený filtrát se bude nacházet na dně zkumavky a DNA z cibule by měla být na rozmezí mezi roztokem DNA Precipitation Solution a filtrátem. DNA vypadá jako obláček jemných viskózních vláken.

- ✚ Naviňte DNA pro podrobnější zkoumání na dřevěnou špejli. Špejli přitom ponořte do zkumavky lehce pod obláček DNA, špejlí otáčejte a přitom s ní opatrně pohybujte mezi DNA a růžovým filtrátem na dně zkumavky dopředu a dozadu. Dejte pozor, aby se vrstvy nesmíchaly. DNA by se měla kolem špejle omotat jako nit na cívce.