

Чекмагушевский район

**Выделение молекулы ДНК из объекта
растительного происхождения в
домашних условиях**

Выполнила: Мустафина Инесса, 11 класс
Руководитель: Хамадиева А.Р.

2014

Содержание

Введение	3
Глава 1. 1.1 Открытие ДНК и нуклеопротеидная теория наследственности	5
1.2 Изучение химического состава и структуры ДНК	6
1.3 Современное представление о структуре ДНК	11
Глава 2. Материалы и методы исследования	13
Глава 3. Результаты собственных исследований и их обсуждение	14
Выводы	17
Заключение	18
Список, использованной литературы	19

Введение

Элементарные понятия о ДНК и ее структуре изучаются в курсе средней школы на уроках биологии и химии. Однако для понимания сложного материала учащимся не хватает наглядности. Научные методы выделения ДНК из клеток очень сложны. Разработка доступного метода выделения нуклеиновых кислот в условиях школьной лаборатории позволит каждому учащемуся увидеть ДНК не в качестве абстракции схем и моделей, а как материю.

Наследственность, гены, ДНК... Эти слова уже давно перестали быть научными терминами, вошли в повседневную жизнь и знакомы теперь каждому старшекласснику. Но никакой ДНК большинство из нас никогда не видело, и можно ли вообще ее выделить и увидеть в лабораторных условиях? Все вышесказанное определило тему исследования.

Цель работы: выделить молекулу ДНК из объекта растительного происхождения

Задачи исследования:

1. Обзор литературы о ДНК
2. Доказать, что выделение ДНК возможно в условиях школьной лаборатории без использования дорогостоящих реактивов и оборудования.

Объект исследования: банан

Предмет исследования: молекула ДНК, содержащаяся в объектах растительного и животного происхождения

Гипотеза: молекулу ДНК можно выделить в домашних.

В соответствии с задачами исследования были использованы методы систематизации теоретического материала, исследовательские методы, обобщение накопленного материала.

Практическая значимость исследования состоит в том, что полученную информацию по результатам исследовательской работы можно использовать на факультативных занятиях и элективных курсах.

Глава 1

1.1 Открытие ДНК и нуклеопротеидная теория наследственности

В настоящее время в сознании многих людей такие термины, как ДНК и генетика, неразделимы. Однако так было не всегда.

В 1868 г. швейцарский химик Ф. Мишер обнаружил в клеточных ядрах, изолированных из гноя, а позже из спермиев лосося вещество, которое он назвал «нуклеином» (от лат. *nucleus* — ядро). Впоследствии Р. Альтманн (1889 г.) сообщил, что выделенный Ф. Мишером «нуклеин» состоит из двух фракций — белковой и нуклеиновых кислот).

Достаточно длительное время считали, что функцию передачи наследственной информации выполняют белки, т. к. нуклеиновые кислоты относительно просты по химической структуре и проявляют «поразительное единообразие» у разных видов растений и животных. Этому заблуждению способствовало предположение Э. Вильсона (сделанное им в 1925 г.) о том, что функциональную роль в хроматине играют белки, а не нуклеиновые кислоты. В 1928 г. крупнейший советский биолог Н. К. Кольцов (1872—1940) разрабатывает гипотезу молекулярного строения и матричной репродукции хромосом, которая легла в основу главных принципов и положений современной молекулярной биологии и генетики. Тем не менее он считает, что хромосома — это гигантская биологическая молекула, обладающая свойством самоудвоения, и что все признаки и свойства организма predeterminedены строением белка и взаимодействием его молекул, а не ДНК.[4]

Иначе говоря, в конце XIX — начале XX вв. в генетике распространилось ошибочное мнение о том, что материальным носителем генетической информации являются белки. О значении нуклеиновых кислот в данных процессах, а равно и о функциях этих химических соединений в организме ничего не было известно. Поэтому этот период в истории изучения ДНК можно смело назвать нуклеопротеидным.

1.2. Изучение химического состава и структуры ДНК

Если основная функция ДНК для многих ученых была понятна, то химическое строение и, в особенности, трехмерная структура нуклеиновых кислот представлялась еще недостаточно ясной.

С момента открытия Миллером в 1868 г. «нуклеина» прошло немало времени. Основные сведения по химическому составу были изложены А. Косселем, биохимиком, работавшим на рубеже XIX-XX вв.

Он установил, что нуклеиновая кислота состоит из четырех азотистых оснований, сахара и фосфорной кислоты. Азотистые основания были представлены двумя пуриновыми (аденин, гуанин) и двумя пиримидиновыми (цитозин и урацил) соединениями.

В 20-х гг. минувшего столетия П. Левеном и У. Джонсом в эту схему были внесены важные уточнения. Ими было обнаружено, что нуклеиновые кислоты имеют две разновидности: РНК и ДНК, различные по химическому строению. РНК, или рибонуклеиновая кислота, содержит пятиуглеродный сахар рибозу, а в ДНК присутствует дезоксирибоза. Наконец, ДНК не содержит урацила, как это полагал А. Коссель, вместо него имеется тимин. Кроме того, установлено, что азотистое основание, сахар и остатки фосфорной кислоты образуют соединение, названное нуклеотидом. В свою очередь, нуклеотиды образуют с помощью фосфодиэфирных связей некое подобие цепочки.

В 1924 г. немецкий химик Р. Фельген предложил гистохимический способ окраски ДНК животных, растений и бактерий. Основу методики составлял реактив Шиффа, который окрашивал ДНК в красно-фиолетовый цвет. С помощью реакции Фельгена ученые установили, что ДНК содержится преимущественно в ядре клетки, а РНК — в цитоплазме.

До 1950 г. среди генетиков и биохимиков господствовала тетра-нуклеотидная теория Ф. А. Левина. Согласно этой теории, все нуклеиновые кислоты — это монотонные макромолекулы, представляющие собою единообразное повторение четырех азотистых оснований —

тетрануклеотидов. При этом полярные соотношения аденина, гуанина, цитозина и тимина представлялись как приблизительно равные. Ошибочность этой теории заключалась в том, что структуру ДНК понимали как элементарное химическое соединение, придавая ему линейный характер. Наличие вторичных и третичных структур у ДНК не учитывалось. Это привело к тому, что долгое время ученые считали, что ДНК не способна выполнить функцию носителя информации.[8]

Эту теорию опроверг Э. Чаргафф. В 1948 г. Эрвин Чаргафф и Хочкисс применили для количественной оценки компонентов нуклеиновой кислоты тогда еще новый метод хроматографии на бумаге. Анализируя таким образом различные образцы ДНК от животных, растений и человека, ученые обнаружили, что точного количественного соответствия азотистых оснований ни в одном из случаев не наблюдалось. Напротив, в зависимости от биологического происхождения ДНК, состав молекулы будет различен. Следовательно, обнаружилось, что ДНК отнюдь не монотонная макромолекула. Обобщая данные своих исследований, Э. Чаргафф в 1949 г. сформулировал правило эквивалентности, которое вошло в историю генетики как правило Чаргаффа. Оно гласит: количественные отношения гуанина всегда равны содержанию цитозина, а содержание аденина соответствует содержанию тимина. Математически это можно записать так:



В 1952 г. на основании работ Э. Чаргаффа и Хочкисса была сформулирована теория, объясняющая, каким образом ДНК содержит в себе генетическую информацию. Основное положение этой теории звучит так: «Генетическая информация определяется специфической последовательностью четырех нуклеотидных оснований в полинуклеотидной цепи.

Следует отметить, что установленные опытным путем количественные соотношения азотистых оснований в молекуле ДНК, выраженные в правиле Чаргаффа, не случайны. Отечественные генетики А. С. Спирин и А. Н.

Белозерский пришли к выводу, что зависимость содержания гуанин-цитозиновых пар определяется филогенетическими (т. е. сложившимися в процессе эволюции) связями между организациями различной видовой принадлежности.[3]

В 1912 г. отец и сын Брегги изобрели метод рентгеновской кристаллографии, основанный на том, что пучок параллельных рентгеновских лучей, падающих на регулярное скопление атомов, образует так называемую дифракционную картину. Дифракционная картина зависит главным образом от атомной массы атомов и их пространственного расположения. В 40-х гг. Астбюри использовал данный метод для определения пространственной структуры ДНК. На основании полученных рентгенограмм автор предположил, что биополимер ДНК представляет собой стопку из уложенных один над другим нуклеотидов. При этом нуклеотиды представлялись им в виде плоских дисков.

Астбюри оставил работу по дальнейшему изучению структуры ДНК. Исследования в начале 50-х гг. по структуре ДНК продолжили три группы ученых. Первую группу возглавил известный в то время своими работами по расшифровке вторичной структуры белков Лайнус Полинг. Вторая группа работала под руководством английского биофизика, члена Лондонского королевского общества Мориса Уилкинса, и, наконец, третью группу представляли Джеймс Уотсон и Френсис Крик.

Первыми представила свою модель в 1953 г. группа Л. Полинга. Однако она не получила всеобщего признания.

Сотрудникам Уилкинса удалось получить очень четкие рентгенограммы ДНК, на которых отчетливо было видно, что молекула нуклеиновой кислоты состоит из двух нитей, и, в частности, подтвердилась гипотеза Астбюри о межнуклеотидном расстоянии, равном 0,34 нм

Одну из таких рентгенограмм ДНК, полученной в лаборатории М. Уилкинса, о публиковал журнал Nature. На эту публикацию обратили внимание Д. Уотсон и Ф. Крик. Анализируя опубликованную

рентгенограмму, они дополнили свои предположения и в апреле 1953 г. опубликовали собственную модель пространственной структуры ДНК, названную впоследствии их именами. Основные положения вторичной структуры ДНК, по Уотсону и Крику, сводятся к следующему:

1) Молекула ДНК представляет собой двойную спираль диаметром 2 нм.

2) Вдоль оси молекулы соседние пары оснований располагаются на расстоянии 0,34 нм одна от другой. Полный оборот спирали приходится на 3,4 нм, т. е. на 10 пар оснований.

Придавая молекуле ДНК форму спирали, Уотсон и Крик исходили из того, что последовательность нуклеотидов в цепи отражает генетическую информацию. Из этого следует, что любая произвольная последовательность оснований вдоль полинуклеотидных цепей ДНК должна соответствовать ее молекулярной структуре. Определенные трудности представляло то обстоятельство, что размеры пуринового кольца были больше, чем пиримидинового. Поэтому, чтобы спираль на всем протяжении имела постоянный диаметр, пуриновое кольцо в одной цепи должно быть расположено строго напротив пиримидинового в другой цепи. Так родился постулат о взаимной комплементарности нуклеотидов. Из этого постулата следует, что аденин (А) образует комплементарные связи только с тиминном (Т), а гуанин (Г) — только с цитозином (Ц).[5]

Правило комплементарности нуклеотидов взаимосвязано и подтверждается правилами Чаргаффа о эквивалентности. Однако основное значение открытия комплементарного спаривания заключается в признании ДНК самокомплементарной молекулой, т. е. генетическая информация записана в полинуклеотидной цепи в виде определенной последовательности четырех азотистых оснований, тогда каждая молекула ДНК несет два полных набора такой информации. Из этого следует, что обе полинуклеотидные цепочки антипараллельны друг другу.

В настоящее время модель ДНК Уотсона и Крика получила всеобщее признание мирового сообщества ученых. В 1962 г. Френсису Крику, Джеймсу Уотсону и Морису Уилкинсу за установление молекулярной структуры нуклеиновых кислот и их роли в передаче генетической информации в живой материи присуждена Нобелевская премия по генетике.

Однако этим исследования ДНК не ограничились. Вскоре выяснилось, что образуемые между двумя полинуклеотидными цепочками водородные связи можно разорвать при помощи нагревания. В результате повышения температуры до 94 град. в структуре ДНК наблюдался переход от спиральной формы к клубку. Такое явление было названо денатурацией ДНК.

В 1960 г. был открыт обратный процесс — восстановления разрушенных водородных связей и реставрации двойной спирали. Данное явление было названо ренатурацией.

Эти открытия полностью подтвердили высказанную еще в 1953 г. Уотсоном и Криком гипотезу о механизме самоудвоения (репликации) ДНК. По их мнению, репликация ДНК происходит путем разрыва водородных связей между двумя полинуклеотидными цепочками.

Разделение и разматывание молекулы начинается с одного конца спирали и продолжается по направлению к другому. Одновременно с разрывом цепочек происходит процесс синтеза новых полинуклеотидов. Результатом этой гипотезы стал сформулированный авторами постулат полуконсервативного характера репликации ДНК. То есть прежняя полинуклеотидная цепочка является как бы шаблоном для синтеза новой.

Значительный вклад в понимание механизмов самоудвоения молекулы ДНК внес Артур Корнберг. Он открыл фермент, который катализирует синтез полинуклеотидной цепочки. Этот фермент Корнберг назвал ДНК-полимеразой. В 1956 г. Корнберг сообщил, что ему удалось синтезировать в пробирке *in vitro* молекулу ДНК.[7]

Эксперимент Корнберга показал, что ДНК используется непосредственно в качестве матрицы, без синтеза каких-либо других

посредников, что полностью согласовывалось с предположениями Уотсона и Крика о репликации ДНК.

В 1969 г. удалось синтезировать ген комплементарной последовательности транспортной РНК.

1.3 Современное представление о структуре ДНК

Работы М. Уилкинса, Д. Уотсона и Ф. Крика, Э. Чаргаффа и многих других ученых заложили фундамент в понимание процессов наследственности, а именно — структуры и биологической роли ДНК в передаче генетической информации.

Наука не стоит на месте, и в настоящее время внесены значительные дополнения и коррективы в представления о строении ДНК, разработанные в середине XX в. Уотсоном и Криком. Без изменения этих данных история изучения ДНК была бы неполной и незаконченной.

Прежде всего, установлено, что ДНК обладает полиморфизмом, т. е. способностью молекулы принимать различные конфигурации. На данный момент описано шесть таких форм. В-форма имеет стандартную структуру, соответствующую модели Уотсона-Крика. Это основной тип ДНК. А-форма представляет собой структуру, схожую для РНК-ДНК дуплексов. Она обнаружена в среде с высокой концентрацией ионов К и Na и низким содержанием влаги. С-форма менее спирализованная, чем В-форма, т. е. имеет меньше нуклеотидов на один оборот спирали, чем остальные разновидности. Д- и Е-формы — крайние варианты С-формы имеют наименьшее число пар оснований на виток — 8 или 7,5. Они обнаружены только в молекулах ДНК, не содержащих гуанина. Z-форма представляет собой спираль с чередованием лево- и правозакрученности. В ДНК человека имеются участки, которые потенциально способны переходить в Z-форму. В 1993 г. установили, что в организме человека существуют условия, которые стабилизируют Z-форму. Установлено, что некоторые из конфигураций ДНК могут переходить друг в друга: А — В; Z — В.

Ученые полагают, что взаимные переходы А- и В-форм регулируют работу генов.

Исследования, направленные на поиск материального носителя наследственности, определили собой рождение новой науки — молекулярной генетики.

История изучения одной молекулы перевернула прежние представления о наследственности и передаче генетических признаков из поколения в поколение.

Методом проб и ошибок была установлена важнейшая роль ДНК в переносе наследственной информации. Отброшены ошибочные теории о том, что генетическую роль в организме выполняют белки, отвергнута бесперспективная и упрощенная тетра nukлеотидная схема строения нуклеиновых кислот.

В начале 50-х гг. Д. Уотсоном и Ф. Криком разработана модель строения молекулы ДНК, разъясняющая, как происходит копирование генетического материала. Вскрыты механизмы этого процесса.

Значительные достижения молекулярной генетики обеспечили прочную основу для таких перспективных направлений, как генная инженерия и биотехнология, планирование генов и многоклеточных организмов.[6]

Глава 2

Материалы и методы исследования

Для работы нам понадобилось следующее оборудование: вилка, нож, ложка чайная; блендер; вода (чистая питьевая); два больших стеклянных стакана; соль; средство для мытья посуды "Феири"; и «Капля», широкий бинт; спирт; банан (твёрдый и зеленоватый!); длинная тонкая палочка (например, карандаш).

ДНК, как известно, есть в каждой клетке, а значит, выделить её можно из любой ткани — даже из костей животных, чешуи рыб или древесины, где клеток не так уж много по сравнению с объёмом внеклеточного вещества.

Во всех тканях организма как животного, так и растения, ДНК, как правило, одинакова. Отличаются эти ткани тем, что в одних из них помимо вещества наследственности больше почти ничего нет (молоки селёдки), а в других, таких, как костная ткань, содержание ДНК относительно невелико. Кроме того, существуют ткани, в клетках которых имеется удвоенный набор хромосом (к тетраплоидным относятся, в частности, клетки печени), а потому и ДНК в них в два раза больше, чем во всех остальных.

Мы, выбрали для работы ткань, в которой мало межклеточного вещества и много самих клеток. Причём такую ткань, которая легко распадалась на эти составляющие, а клетки не были перегружены белками (как мышечные), липидами (как жировые) или полисахаридами (как клетки мозга).

Для работы мы выбрали банан.

Глава 3

Результаты собственных исследований и их обсуждение.

Взяли половину банана и разрезав его на кусочки поместили в стакан. и помещаем в стакан. Измельчили всю массу миксером. В миксере ткань, из которой мы собирались добыть вещество наследственности, распадается на отдельные клетки. Добавили к измельченному банану 150 мл. воды, 1 чайную ложку соли (немного соли нужно добавить в раствор для того, чтобы клетки не полопались раньше времени: давление внутреннего содержимого на клеточную мембрану изнутри уравновесили давлением соляного раствора снаружи); 2 чайных ложки «Фери» в один раствор и две чайные ложки «Капли» в другой. Средство для мытья посуды годится и для того, чтобы наделать больших дырок в липидной мембране как самой клетки, так и её ядра. В результате такой обработки всё клеточное содержимое вывалится наружу и окажется в растворе, который делается при этом очень вязким, тягучим и существенно более прозрачным, чем была клеточная суспензия.

Перемешали вилкой хорошо содержимое в течении 2 минут .



Аккуратно отфильтровали раствор через широкий бинт в новый стакан. В данном случае фильтрация нужна для того, чтобы механически удалить из клеточной суспензии всевозможные примеси, в том числе, крупные куски.



Добавили к полученному раствору спирт. В методике написано, что спирт нужно добавлять из расчета на 1 часть раствора 3 части спирта, я добавила к 4 ложкам раствора 12 ложек 95%-ного спирта. Если концентрация спирта будет низкой и упадет при смешивании с водной фазой до 60-65%, ДНК в кристаллическое состояние не перейдет. Нижние слои спирта частично смешаются с раствором ДНК, начинается процесс кристаллизации нуклеиновых кислот, и они всплывают на поверхность (где спирт более концентрированный) в виде хлопьев.





Перемешали палочкой и появившееся белые нити – это ДНК!



При использовании «Фери» в качестве средства разрушающего мембраны выделяется больше ДНК, значит «Фери» более активно разрушает клеточные мембраны.

Выводы

1. Роль ДНК в клетке заключается в хранении, воспроизведении и передаче генетической информации. Благодаря матричному синтезу наследственная информация дочерних клеток точно соответствует материнской. В настоящее время известно множество фактов, свидетельствующих о том, что ДНК определяет специфичность и химические свойства генов – единиц наследственности.

2. В результате проделанного эксперимента доказана возможность выделения ДНК в условиях школьной лаборатории, без использования сложной аппаратуры и дорогостоящих реактивов.

Заключение

Вопросы наследственности, передачи отдельных признаков от родителей потомству, самовоспроизводства живых организмов на Земле издавна волновали человечество. В разные эпохи различными учеными выдвигалось множество теорий, своеобразно объясняющих подобные процессы. Но истинные ответы на эти вопросы человечество смогло найти лишь спустя несколько тысяч лет, с появлением и развитием генетики — науки о наследственности и изменчивости организмов. Официальной датой рождения генетики считают 1900 г., когда трое ученых — голландец Х. де Фриз, немец К. Коренс и австриец Э. Чермак — независимо друг от друга переоткрыли законы Грегора Менделя о наследовании генетических признаков.

С развитием точных наук и техники менялись методы и уровни изучения живой материи. Наряду с классической генетикой, появились такие важные направления, как цитогенетика, генетика человека, генетика микроорганизмов, биохимическая, эволюционная генетика, космическая генетика, молекулярная генетика и многое др.

Список, использованной литературы

1. Беляев Д. К., Иванов В. И. Выдающиеся советские генетики (сборник биографических очерков). М.: Наука, 1980. С. 147.
2. Гайсинович А. Е. Зарождение и развитие генетики. М.: Наука, 1988. С. 422.
3. Гуляев Г. В. Генетика. М.: Колос, 1971, С. 345.
4. Приходченко Н. Н., Шкурат Т. П. Основы генетики человека. Ростов-на-Дону: Феликс, 1997. С. 360.
5. Пехов А. П. Введение в молекулярную генетику. М.: Медицина, 1973. С. 265.
6. Рейвин А. Эволюция генетики. М.: Мир. 1967.
7. Реннеберг Р., Реннеберг И. От пекарни до биографии. М.: Мир, 1991. С. 110.
8. Стент Г. Молекулярная генетика. М.: Мир, 1974. С. 532.