

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ КУРСКОЙ ОБЛАСТИ

областное бюджетное профессиональное образовательное учреждение
«Курский государственный политехнический колледж»
(ОБПОУ «КГПК»)

Выделение клеточной органеллы ДНК из растительной клетки
Номинация «Клеточная биология, генетика и биотехнология»

Выполнил:
Поправко Анастасия Сергеевна,
обучающаяся объединения «Биоквантум»
ОБПОУ «Курский государственный политехнический колледж»

Руководитель:
Мальцева Елена Ивановна,
педагог дополнительного образования ОБПОУ «КГПК»

г. Курск – 2023 год

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.....	3
1.Теоретический анализ по теме исследования.....	4
2.Методика и этапы исследования.....	8
3. Результаты исследований.....	
Заключение	
Список литературы	

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы обусловлена тем что, извлечение дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) из листьев или семян растений, хотя и не новая концепция, является ключом к разработке растительных технологий будущего.

ДНК растений служит исходным материалом для многих последующих методов молекулярной биологии, включая ПЦР и NGS, а экстракция нуклеиновых кислот является основополагающей для рабочих процессов многих академических исследователей и коммерческих селекционных программ.

В современной агробиотехнологии и агрогеномике, получение точных и действенных данных для сельскохозяйственных исследований, от поиска альтернатив обезболивания для опиоидов до глобальной продовольственной безопасности и смягчения последствий изменение климата зависит от высококачественной растительной ДНК, что делает методы, а также время и затраты, необходимые для их выполнения, важными для многих исследователей растений.

Выделение ДНК хорошего качества является необходимым условием для молекулярных исследований. Поддержание выхода и качества ДНК во время экстракции растительной ДНК является одной из сложных задач по сравнению с животными из-за ее жесткой клеточной стенки, которая состоит из целлюлозы вместе с другими химическими компонентами, такими как полисахариды, полифенолы, белки и липиды, которые действуют как загрязняющие вещества во время выделения ДНК. Количество этих компонентов варьируется в зависимости от вида растения, используемой части растения, условий окружающей среды и стадии роста, и это очень проблематично при выделении ДНК.

Объектом исследования является органелла ДНК растения банан.

Предмет исследования – процесс выделения ДНК из клеток растения банан.

Целью работы является выделение клеточной органеллы ДНК из растительной клетки.

Для достижения поставленной цели, необходимо решить следующие **задачи**:

- рассмотреть теоретические основы клеточного строения клетки;
- рассмотреть основные этапы экстракции ДНК растений;
- произвести выделение клеточной органеллы ДНК из растительной клетки банана.

Срок проведения исследования – сентябрь-декабрь 2022 года.

1. Теоретический анализ по теме исследования

Клетки составляют все живое, от голубых китов до археобактерий, которые живут внутри вулканов.

Существует два основных типа клеток: прокариотические и эукариотические. Прокариоты - это клетки, у которых нет связанных с мембраной ядер, тогда как у эукариот они есть.

У всех клеток есть мембраны (каркас), ДНК (основные данные) и рибосомы (производственная линия), и поэтому они способны производить белки (продукт).

Органелла (внутренний орган клетки) - это мембраносвязанная структура, находящаяся внутри клетки. Точно так же, как у клеток есть мембраны, чтобы удерживать все внутри, эти мини-органы также связаны двойным слоем фосфолипидов, чтобы изолировать свои маленькие отделения внутри более крупных клеток.

Ниже приведена таблица органелл, обнаруженных в основной клетке растений, которую будем использовать в качестве опоры для нашей работы.

Таблица 1. Органеллы в клетке растений

Органелла	Функция
Ядро	Хранение ДНК
Митохондрия	Производство энергии
Гладкий эндоплазматический ретикулум (SER)	Производство липидов; Детоксикация
Грубый эндоплазматический ретикулум (RER)	Производство белка; в частности, для экспорта из клетки
Аппарат Гольджи	Модификация и экспорт белка
Пероксисома	Разрушение липидов; содержит окислительные ферменты
Лизосома	Разрушение белка

1.1. Ядро

В ДНК есть определенные данные для каждого белка в растительном организме, все они упакованы в аккуратную двойную спираль. Процессы превращения ДНК в белки известны как транскрипция и трансляция и происходят в разных компартментах клетки.

Первый шаг, транскрипция, происходит в ядре, в котором содержится наша ДНК. Мембрана, называемая ядерной оболочкой, окружает ядро, и ее задача состоит в том, чтобы создать внутри клетки пространство, как для защиты генетической информации, так и для размещения всех молекул, которые участвуют в обработке и защите этой информации. Эта мембрана на самом деле представляет собой набор из двух липидных бислоев, так что существует четыре слоя липидов, отделяющих внутреннюю часть ядра от цитоплазмы. Пространство между двумя бислоями известно как околоядерное пространство.

Хотя часть функции ядра заключается в отделении ДНК от остальной части клетки, молекулы все равно должны иметь возможность входить и выходить (например, РНК). Белковые каналы, известные как ядерные поры, образуют отверстия в ядерной оболочке. Само ядро заполнено жидкостью (называемой нуклеоплазмой) и по структуре и функциям похоже на цитоплазму. Именно здесь, в нуклеоплазме, находятся хромосомы (плотно упакованные нити ДНК, содержащие все генетические данные).

Благодаря дополнительной защите ядерной оболочки ДНК немного более защищена от ферментов, патогенов и потенциально вредных продуктов жирового и белкового обмена. Если бы ДНК не была изолирована, она была бы уязвима для повреждения вышеупомянутыми опасностями, что затем привело бы к дефектному формированию белка. Представьте себе огромную дыру или кофейное пятно в чертежах вашей игрушки - внезапно у вас не хватает нужной информации, чтобы сделать важную деталь игрушки.

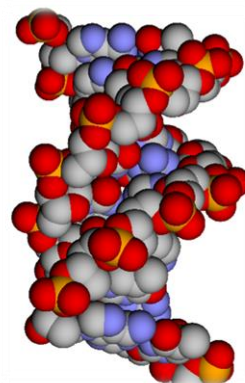
Ядерная оболочка также удерживает молекулы, ответственные за транскрипцию и репарацию ДНК, близко к самой ДНК - в противном случае эти молекулы распространились бы по всей клетке.

В то время как транскрипция (создание комплементарной цепи РНК из ДНК) завершается в ядре, трансляция (создание белка из инструкций РНК) происходит в цитоплазме. Если бы не было барьера между механизмами транскрипции и трансляции, возможно, что некачественная или незавершенная РНК превратилась бы в некачественные и потенциально опасные белки. Прежде чем РНК сможет покинуть ядро для трансляции, она должна получить специальные модификации в виде шапки и хвоста на обоих концах молекулы, которые действуют как приказ запуска, чтобы клетка знала, что этот фрагмент РНК завершен и сделан правильно.

Строение ДНК

ДНК - это наследственный или генетический материал, присутствующий во всех клетках, который несет информацию о структуре и функциях живых существ.

В царстве растений ДНК, или дезоксирибонуклеиновая кислота, содержится в мембраносвязанных клеточных структурах ядра, митохондрий и хлоропластов. ДНК обладает несколькими свойствами, уникальными среди химических молекул.



Она универсальна для всех живых организмов, имеет одинаковую структуру и функцию в каждом. Она способна воспроизводить себя в процессе, известном как саморепликация. Это свойство обеспечивает деление клеток и, следовательно, непрерывность, рост и восстановление.

ДНК - это простая молекула, состоящая из четырех нуклеотидов. Каждый нуклеотид содержит пятиуглеродный сахар (дезоксирибозу), фосфат и одно из четырех возможных азотистых оснований: двухкольцевые пурины аденина (А) и гуанина (G) и однокольцевые пиримидины тимина (Т) и цитозина (С).

Большинство свойств ДНК связано с уникальными связями, которые образуются между нуклеотидами: сахарофосфатные компоненты выстраиваются линейно, в то время как азотные кольца соединяются перпендикулярно.

Азотные кольца дополнительно связываются очень специфическим образом: А всегда соединяется с Т, а G - с С. ДНК-молекула, таким образом, выглядит как лестница, сторонами которой являются сахар-фосфат; ступени, пары АТ и GC.

Дальнейшее склеивание и сворачивание создает структуру в форме спиральной лестницы, известную как двойная спираль. Эта двойная спираль компактно упакована в веревкообразные структуры, известные как хромосомы, которые видны под световым микроскопом до и во время деления клеток.

Во время повседневной жизни клетки ДНК выглядит как неразличимая темная масса, называемая хроматином (инклюзивный термин, относящийся к ДНК и связывающимся с ней белкам, расположенным в ядрах эукариотических клеток).

Основные этапы экстракции ДНК растений

В общем, экстракцию и очистку ДНК растений можно разделить на шесть этапов:

- 1) разрушение / гомогенизация клетки;
- 2) лизис клеток в буфере для экстракции ДНК;
- 3) отделение ДНК от других клеточных компонентов,;
- 4) осаждение ДНК;
- 5) промывка ДНК;
- 6) Сбор / ресуспендирование ДНК для последующей обработки.

Хотя это звучит просто с биохимической точки зрения, природа исходного растительного материала может представлять уникальные технические проблемы, которые может быть трудно преодолеть даже опытным ученым. По этой причине было разработано несколько различных методов извлечения ДНК из растений, которые используются для различных применений.

Различные методы извлечения ДНК растений

На протяжении десятилетий традиционным протоколом для эффективного и надежного извлечения ДНК из растений была экстракция

цетилтриметиламмония бромидом (СТАВ), впервые разработанная в 1987 году. С годами в протокол вносились технические изменения, чтобы сделать его более применимым к различным видам растений. Кроме того, протоколы, включающие этап взбивания шариков, оказались особенно полезными для видов растений с толстыми клеточными стенками, которые трудно разделить.

Также появились процедуры на основе колонок с использованием кремнеземной мембраны в условиях, способствующих связыванию ДНК. Аналогичным образом, магнитные шарики используются для извлечения ДНК растений и (как и процедуры на основе колонок) позволяют эффективно промывать и очищать ДНК.

Таким образом, изучение ДНК у растений продолжает быть одной из актуальных задач в биотехнологии, генной инженерии. А так как растения очень удобный материал для научных генетических изысканий, то продолжается разработка методов позволяющих выращивать растения из отдельных клеток с учетом нужных параметров и задач, которые и получают из нужных выделенных структур ДНК.

2.Методика и этапы исследования

Методика исследования: экстрагирование ДНК из живого растительного образца банана с помощью химического разрушения клеток и спиртового осаждения нуклеиновых кислот.

В качестве исследуемого биологического материала мы взяли растительный образец: банан.

Для проведения исследования нам требуется следующее **оборудование и материалы:**

- пробирка 5 мл. - 2 шт;
- ступа для измельчения;
- штатив для пробирок;
- воронка;
- колба;
- фильтровальная бумага;
- весы ювелирные;
- хлорид натрия (поваренная соль) - 1,5 г;
- гидрокарбонат натрия (сода) - 5 г;
- дистиллированная вода- 50 мл;
- моющее средство Fairy- 30 мл.;
- 95%-й этиловый спирт охлажденный.

На первом этапе экспериментальной части мы приготовили буферный раствор.

Буферный раствор- раствор с определённой устойчивой концентрацией водородных ионов, рН которого мало изменится при прибавлении к нему небольших количеств сильного основания или сильной кислоты, а также при разбавлении и концентрировании.

Для этого в колбу с дистиллированной водой (фото 3) добавили взвешенные хлорид натрия (фото 1) и гидрокарбонат натрия (фото 2), и все это тщательно перемешали; эти вещества в совокупности способствовали разрушению клеточных оболочек и мембран в клетках.



Фото 1.

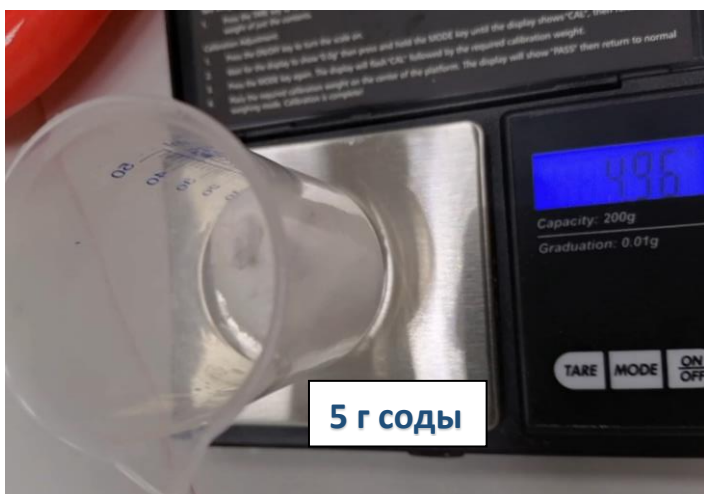


Фото 2.

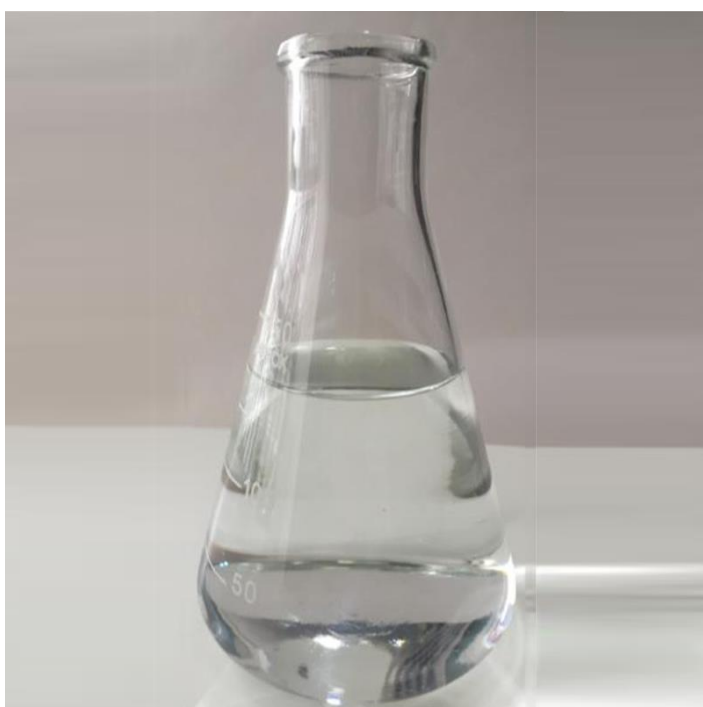


Фото 3.

После добавили моющее средство Fairy- 30 мл. (фото 4), который является детергентом и в дальнейшем лизировал клеточную мембрану, эффективно разрушил ДНК-белковые комплексы.



Фото 4.

Также для изучения растительной клетки и выделения из нее ДНК размяли мякоть банана в ступке до состояния пюре (фото 5).



Фото 5.

Полученную массу мякоти банана добавили в холодный буферный раствор и перемешали до полного смешения (фото 6).



Фото 6.

Этот раствор разрушил внутренние связи в клеточных мембранах и связи между органеллами внутри клетки, а также позволил освободиться ДНК от внутриклеточных связей.

Далее раствор процедили через фильтровальную бумагу, для удаление ненужных при исследовании клеточных структур (фото 7).



Фото 7.



Фото 8.

Для визуализации выделенной ДНК добавили по стеночке колбы под острым углом охлажденный в морозилке 95% этиловый спирт (фото 8).

Добавляли практически по объему равного половине отфильтрованного раствора.

И увидели, что стали видимыми нити ДНК в отфильтрованном растворе (фото 9). Это произошло потому, что только ДНК среди клеточных компонентов быстро выпадает в осадок в спирте, образуя белые нити. Все остальные клеточные остатки в водной фазе раствора оседают.



Фото 9.

При проведении исследования мы получили выделенную ДНК из растительной клетки банана и смогли ее увидеть.

Заключение

Мы рассмотрели значение экстракции ДНК в процессе развития научного знания, охарактеризовали основные методы экстрагирования, узнали о их практическом применении в различных аспектах научных исследований и хозяйственно-экономической деятельности, о применении в народном хозяйстве.

Мы также провели эксперимент по практическому извлечению (экстракции) ДНК из растительных образцов одним из методов и закрепили навыки лабораторной работы с биологическими образцами промышленным набором и рутинным методом.

Сравнили методы экстрагирования и из полученных результатов опытов, выявили наиболее эффективный и доступный способ экстрагирования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Буферные растворы: приготовление и использование [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://fb.ru/article/44036/bufernyie-rastvoryi-prigotovlenie-i-ispolzovanie>
2. Великов В. А. Молекулярная биология. Практическое руководство. – Саратов: Издательство «Саратовский источник», 2013. – 84 с.2.
3. Кравченко, Ю. В. Сравнение эффективности разных методов экстрагирования ДНК / Ю. В. Кравченко, М. В. Данилова. - Текст : непосредственный // Юный ученый. - 2022. - № 1 (53). - С. 39-42. – URL: <https://moluch.ru/young/archive/53/2719/> (дата обращения: 16.11.2022)