IZOLÁCIA DNA

|  |  |
| --- | --- |
| ***Tematický celok / Téma*** | ***ISCED / Odporúčaný ročník*** |
| Molekulové základy dedičnosti/Základy bunkovej dedičnosti  **Izolácia DNA** | ISCED3A / 2. ročník |
| ***Ciele*** | |
| ***Žiakom osvojované vedomosti*** | ***Žiakom rozvíjané zručnosti a spôsobilosti*** |
| * poznať lokalizáciu DNA v eukaryotickej aj prokaryotickej bunke, * vedieť vybrať chemické pomôcky a zostaviť filtračnú aparatúru potrebné k realizácii zadaného praktického cvičenia, * vedieť zdokumentovať výsledok praktického cvičenia fotograficky, spracovať priebeh experimentu formou videa a umiestniť ho na YOUTUBE, * naučiť sa pracovať tímovo s rešpektovaním názorov iných členov skupiny, spravodlivým rozdelením čiastkových úloh a ich zodpovedným plnením. | * Pracovať kooperatívne v skupinách * Diskutovať/obhajovať názory a výsledky/argumentovať * Rozvíjať kritické myslenie * Predpovedať výsledok experimentu * Realizovať experiment * Zaznamenávať a interpretovať výsledky pozorovania * Porovnať výsledky experimentu * Prezentovať výsledky pred spolužiakmi * Zovšeobecniť výsledky do záverov * Vypracovať pracovný list s laboratórnym protokolom * Dokumentovať priebeh experimentu formou fotografií a videa   Prenášať získané médiá do počítača a spracovať ich do požadovanej podoby a výstupu |
| ***Požiadavky na vstupné vedomosti a zručnosti*** | |
| * poznať typy nukleových kyselín a ich zloženie, * poznať stavbu eukaryotickej a prokaryotickej bunky, * poznať zásady bezpečnosti a ochrany zdravia pri práci v laboratóriu, * zostaviť filtračnú aparatúru, * realizovať experiment, * sformulovať záver pozorovaní. | |
| ***Riešený didaktický problém*** | |
| Žiaci sa učia reálne si predstaviť a makroskopicky vnímať nositeľku genetickej informácie - DNA, ktorú metódou riadeného bádania izolujú z buniek. Realizácia experimentu má motivačný náboj počas celej realizácie až do samotného záveru, v ktorom ,,zhmotnia“ abstraktnú predstavu o tom ako vyzerá. Študenti nepredpokladajú, že je možné ju získať jednoduchým postupom aj v školských podmienkach. Naučia sa pracovať v skupinách, riadiť a plánovať prácu, uvedomiť si a aplikovať medzipredmetové vzťahy s chémiou, nakoľko experimentálne metódy v biológii sa bez chemických metód, postupov a látok nezaobídu. Načŕta sa tu aj problematika mutácií, konkrétnejšie polyploídie a GMO, pretože množstvo získanej DNA po izolácii, ktoré narastá priamo úmerne v súvislosti s množstvom DNA v chromozómoch buniek. Napríklad z dôvodu polyploídie sa u kivi vyskytuje 6n sád, banánov 3n a v prípade jahôd je počet chromozómových sád prítomný až 8-násobne (8n). Preto aj komerčne dostupné plody sú niekoľkokrát väčšie v porovnaní s dopestovanými prirodzene. | |
| ***Dominantné vyučovacie metódy a formy*** | ***Príprava učiteľa a pomôcky*** |
| * Riadené bádanie * Diskusia * Rozhovor * Metóda kladenia otázok * Experiment * Pozorovanie * Práca s laboratórnym protokolom * Tvorba videa z realizácie experimentu * Porovnávanie výsledkov * Prezentácia výsledkov * Formulácia záverov * Argumentovanie * Skupinová forma * Frontálna forma | * vytlačené pracovné protokoly z lpraktického cvičenia (Variant 1 alebo alternatívu) podľa počtu vytvorených skupín žiakov, * Igelitový sáčok, dvojmetrový špagát, kúsky papiera – na zostavenie jednoduchého modelu DNA lokalizovaného v bunke (špagát omotaný okolo kúskov papiera simuluje DNA obtočenú okolo histónových bielkovín, sáčok predstavuje bunkové povrchy) * chemický plášť, plod zrelej kivi, jahody, banán prípadne cibuľa kuchynská (*Allium cepa*) – podľa vlastného výberu, (optimálny výber je 2-3 druhy z dôvodu porovnania), kremenný piesok, trecia miska s roztieradlom, filtračný lievik, filtračný papier alebo gáza, filtračný kruh, nožnice, stojan, sklenená tyčinka, digitálne váhy, stopky alebo hodinky * Pre alternatívu je potrebná čerstvá šťava zo zrelého ananásu   **Poznámka:** pomôcky pre prípravu filtračnej aparatúry je potrebné naplánovať podľa toho, aký počet skupín chcete vytvoriť  **Odporúčanie:**  etanol odporúčame nechať chladiť v objeme cca 30 - 50 ml v jednej kadičke spoločne pre všetky skupiny  **Chemikálie pre 1 skupinu:** kuchynská soľ (3 g), destilovaná voda (100 ml), tekutý prostriedok na umývanie riadu (10 ml), vodný kúpeľ (do 60°C), etanol (1:1) k množstvu získaného filtrátu) |
| ***Diagnostika splnenia vzdelávacích cieľov*** | |
| * Rozhovor, diskusia * Pozorovanie činností * Správne vyplnený protokol z laboratórneho cvičenia s fotografiami a jednoznačne formulovaným záverom * Video v rozsahu maximálne 3 minúty dokumentujúce celý priebeh realizovaného experimentu zaujímavou formou od jeho začiatku, cez dosiahnutie výsledného produktu až po porovnanie získanej DNA zo všetkých použitých biologických materiálov | |

IZOLÁCIA DNA

Úvod

Vypracovaná metodika Izolácia DNA môže byť implementovaná pri vyučovaní genetiky v rámci alebo pred preberaním témy Molekulové základy dedičnosti alebo Základy bunkovej dedičnosti.

Poznatky a zručnosti nadobudnuté v metodike sú využiteľné počas výučby genetiky všeobecne a dá sa na nich priebežne odvolávať. Načŕta aj problematiku polyploídie, mutácií a GMO, teda je možné, že záujem a zvedavosť študentov pootvorí dvere aj do tejto ,,komnaty“.

Podľa časových možností je možné zvoliť si z 2 variantov:

Variant 1: Realizácia všetkých aktivít metodiky vrátane evokácie (odporúčame plánovať na 2VH)

Variant 2: Realizácia samotnej experimentálnej časti izolácia DNA, bez evokácie (postačuje časová dotácia 1VH)

1. Klasický variant – izolácia DNA pomocou saponátu, kuchynskej soli, ľadového etanolu
2. Alternatíva 2 – jednoduchší spôsob izolácie DNA pomocou enzýmu bromelaín z čerstvej šťavy ananásu

Priebeh výučby

1. EVOKÁCIA (cca 8 min.):

**Zámer:** nadviazať na vedomosti žiakov, motivovať a zaktivizovať ich.

|  |
| --- |
| **Nositeľkou genetickej informácie vo všetkých živých organizmov je ....** |

Žiaci by už túto informáciu mali vedieť doplniť ...odpoveďou by malo byť **DNA (okrem RNA vírusov)**

Ak sa žiaci obmedzia iba na odpoveď, že je to DNA, otázkami ich naveďte k formulácii so špecifikáciou výnimky.

**Pýtajte sa:**

Kde je DNA lokalizovaná?

Žiaci by mali na základe vedomostí o bunke, o jej organelách vedieť špecifikovať, že je potrebné rozlíšiť bunku na prokaryotickú a eukaryotickú a až tak lokalizovať konkrétne miesta výskytu. Očakávate teda odpovede:

*V eukaryotickej bunke v jadre a semiautonómnych organelách (mitochondrie, chloroplasty).*

*V prokaryotickej bunke ako kruhová DNA (nukleoid, prokaryotický chromozóm) a v plazdmidoch (malé kruhové DNA).*

*Podajte náhodnému žiakovi pripravený uzatvorený igelitový sáčok, ktorý obsahuje dvojmetrový špagát obtočený okolo kúskov papiera, predstavujúci DNA v jadre.*

Pýtajte sa ich, čo im to pripomína.

* Požiadajte žiakov, aby si nechali ,,model“ kolovať a súčasne sa voľne vyjadrovali k tomu, čo vidia. Spoločne by mali dospieť k tomu, že je to veľmi jednoduchý model bunky - sáčok predstavuje bunkové povrchy a v jeho vnútri sa nachádza (špagát) DNA obtočená okolo histónových bielkovín.

Otázkami ich k tomu navádzajte.

Ak budú chcieť vidieť obsah sáčka, požiadajte ich, aby ho **roztrhli** a vybrali obsah. Aktivita navádza na samotnú izoláciu, nakoľko vlastnej izolácii musí predchádzať rozrušenie buniek.

* Požiadajte žiakov, aby rozvinuli špagát, natiahli ho a pokúsili sa odhadnúť jeho dĺžku.

Jeho dĺžka odpovedá dĺžke ľudskej DNA, teda 2 metre.

**Výskumná otázka:**

**To, že DNA je pravotočivá dvojzávitnica si vieme predstaviť podľa modelu, avšak ako vyzerá v skutočnosti?**

**Povedzte cieľ VH:**

Cieľom dnešného experimentu bude izolovať DNA, aby ste mohli autenticky vidieť ako vyzerá.

2. uvedomenie si významu (cca 45 min.):

Zámer: Formulovať hypotézu, riadeným bádaním experimentálne izolovať DNA s overiť, prípadne opraviť stanovenú hypotézu. Nadobudnúť zručnosti pri experimentálnej práci, rozšíriť a prehĺbiť poznatky o DNA.

Rozdeľte žiakov do 4-5 vyvážených skupín po maximálne 3-4 členov podľa vlastného uváženia. Rozdajte každej skupine vytlačený laboratórny protokol a požiadajte ich, aby si jeho obsah pozorne prečítali. Pýtajte sa ich na prípadné nejasnosti.

Podľa záujmu rozdeľte žiakom materiál, z ktorého budú DNA extrahovať (kivi, jahody, cibuľa, banán).

**Povedzte:**

Na začiatok formulujte hypotézu o tom, ako predpokladáte, že bude izolovaná DNA vyzerať.

Požiadajte ich aby si jej znenie zapísali do laboratórneho protokolu.

**Povedzte žiakom:**

***Poďme si teda vaše hypotézy overiť.***

**Zadajte inštrukcie:**

* vašou úlohou je v skupinách realizovať experiment podľa vypracovaného postupu.
* zvoľte si jedného člena skupiny, ktorý bude natáčať priebeh.

Upozornite žiakov na dodržiavanie pokynov a zásad bezpečnosti pri práci a dôležitosť tímovej spolupráce.

Dajte im pokyn, že môžu začať pracovať.

Počas realizácie experimentu zapájajte všetkých žiakov otázkami, sledujte ich zapojenosť, organizáciu práce, delenie úloh a usmerňujte ich prácu podľa potreby.

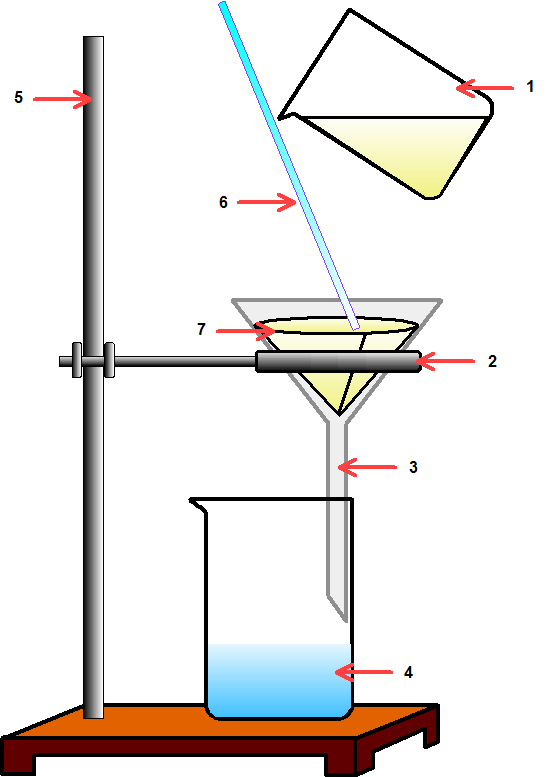
|  |
| --- |
| **Pýtajte sa žiakov:**  *Prečo používame kremenný piesok? (*Odvolajte sa na to, prečo roztrhli igelitový sáčok v úvode)  *Akú úlohu má pridávanie saponátu k zmesi?* (detergent, slúži na rozrušenie lipidovej dvojvrstvy cytoplazmatickej membrány)  *Čo si myslíte, ktorý plod bude na experiment najvhodnejší, ktorým dosiahneme najviditeľnejší výsledok?*  *Prečo nesmie teplota kúpeľa presiahnuť 60 ˚C?* (Dôvod – zvýšením teploty nad uvedenú dochádza k denaturácii DNA)  *Akú funkciu má etanol v experimente? (*do tejto fázy sa vyzráža DNA uvoľnená z buniek, vyzrážaná NK sa nazýva **precipitát**) |

Cieľom diskusie je rozvíjať ich kritické uvažovanie.

**Poznámka:** Filtračnú aparatúru si zostaví každá skupina žiakov samostatne. Žiaci nemajú k dispozícii postup, mali by si ju z dostupných pomôcok z postupu zostaviť sami.

Dbajte o správnosť zostavenej aparatúry, sledujte ich prácu, aj akým spôsobom pripravujú filtračný papier. Usmerňujte ich v činnosti, korigujte prípadné chyby a nedostatky.

Dbajte na to, aby filtračný papier nepresahoval okraj filtračného lievika, alebo nebol naopak príliš malý, navlhčili ho vodou pred filtráciou a nepretrhli pri manipulácii, spodnú časť lievika mali opretú o stene kadičky, v ktorej zachytávajú filtrát, mali vo vhodnej výške umiestnený filtračný kruh, liali zmes po tyčinke, skrutky aparatúry boli umiestnené po pravej ruke...

**Filtračná aparatúra:**

|  |  |
| --- | --- |
|  | Roztok so suspenziou |
|  | Filtračný kruh |
|  | Filtračný lievik |
|  | Kadička s filtrátom |
|  | Laboratórny stojan |
|  | Sklenená tyčinka |
|  | Filtračný papier |

**Obr. 1** Filtračná aparatúra (Zdroj: <http://predmety.skylan.sk/laboratory/A3/hry/filtracia.htm>)

3. REFLEXIA (8 min.)

Zámer: Zhrnúť, prepojiť a upevniť získané vedomosti žiakov.

Po ukončení vyvíjania experimentu sa pýtajte žiakov:

**Otázka: Čo ste zistili?**

Na výskumnú otázku získali žiaci odpoveď ***riadeným bádaním*** realizáciou experimentu a získaním jeho výsledkov.

**Úloha 1: Porovnajte si výsledky experimentov navzájom. Diskutujte o výsledkoch.**

**Úloha 2: Rozhodnite, ktorá na základe získaných výsledkov na pokus najvhodnejšia. Argumentujte svoj výber.**

**Úloha 3: Overte vyslovenú hypotézu, potvrďte ju, prípadne opravte jej znenie na platné.**

**Domáca úloha:**

**Na nasledujúcu VH prineste:**

vypracovaný laboratórny protokol s fotograficky zdokumentovaným výsledkom experimentov,  jasne sformulovaným záverom a prípadne linkom na vyhotovené video s maximálne 3 minútovým trvaním umiestnené na YOUTUBE, dokumentujúce priebeh experimentu spracované zaujímavou formou.

Vytvorené skupinové videá žiaci budú/môžu prezentovať na nasledujúcej VH.

**Poznámka:** Príklad vyhotoveného žiackeho videa izolácie z kivi nájdete na linku <https://www.youtube.com/watch?v=ivp8RVMrSjI>

Postrehy a zistenia z výučby

Budú doplnené po overení.

Alternatívy metodiky

Doplnené ako alternatívny pracovný list izolácie DNA pomocou čestvej ananásovej šťavy.

Použitá literatúra a zdroje

**Višňovská, J. – Ušáková, K. – Gálová, E. – Ševčovičová, A.**: *Biológia pre 2. ročník gymnázia a 6. ročník gymnázia s osemročným štúdiom*. 2012. Bratislava: SNP – Mladé letá, 1. vyd. ISBN 987-80-1002286-1

UŠÁKOVÁ, K. a kol.: *Biológia pre gymnáziá 8 Praktické cvičenia a seminár II*. Prvé vydanie. Bratislava: Slovenské pedagogické nakladateľstvo- Mladé letá. 2009. 127s. ISBN 978-80-10-01370-8

**Gbelcová, H. – Repiská, V. – Shawkatová, I**.: *Nukleové kyseliny a proteíny. Analytické metódy a postupy*. Univerzita Komenského v Bratislave. 2017. ISBN 978-80-223- 4472-2 Dostupné na: <https://zona.fmed.uniba.sk/uploads/media/Nukleove_kyseliny_a_proteiny.PDF>

Obrázok filtračnej aparatúry: <http://predmety.skylan.sk/laboratory/A3/hry/filtracia.htm>