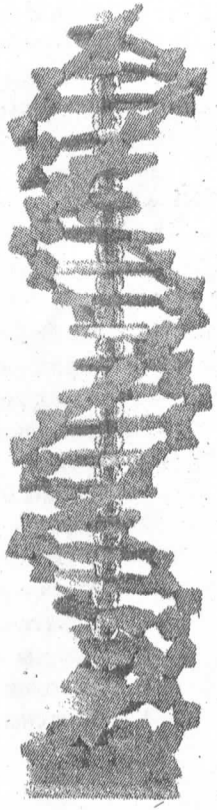
Методичні поради

«МОЛЕКУЛЯРНА БІОЛОГІЯ»

Застосування елементарного лабораторного обладнання та реактивів для підвищення мотивації учнів при вивченні фізико-хімічних процесів

Світлана НАЗАРЕНКО, *методист ІППО КМПУ імені М. Грінченка,*
Марія СЛОНЕНКО, *випускниця УГЛ КНУ імені Тараса Шевченка*

Мотивація учнів до вибору наукової діяльності та кар'єри може починатись із середньої та старшої школи демонстрацією дослідів за методиками, що використовуються у науково-дослідних інститутах. Налагодження контактів між діючими дослідниками та молоддю, безсумнівно, позитивно впливає на формування світогляду дітей та створює систему педагогіки співробітництва, стимулює інтерес учнів до науки. Це має велике значення і в розв'язанні соціальних питань, розвиває якості творчої особистості. Врешті-решт, така взаємодія і співпраця зменшує гостроту підбору аспірантів, кваліфікованих наукових кадрів, бо за останні 10 років у багатьох країнах Європи знизилася кількість викладачів точних та природничих дисциплін і, як наслідок для суспільства, — неможливість підтримувати сучасний рівень економічної і технологічної освіти.



Одним із варіантів виходу з такої ситуації є стимулювання інтересу школярів до питань сучасної науки.

Європейська Навчальна Лабораторія Наук про Життя розробила матеріали для навчальних програм, придатні для використання вчителями в шкільних умовах.

З 2005 р. в Україні відбулася низка семінарів у ряді міст та обласних центрів за програмою «Досягнення молекулярної біології — у сучасну школу». Одним з найважливіших завдань цієї програми є підвищення статусу викладача і предмета в школі, розуміння учнями своїх схильностей і здібностей, співпраця з колегами та батьками, урізноманітнення теоретичного матеріалу з хімії та біології додатковими дослідами та лабораторними роботами.

При цьому вчителі одержують знання з галузей сучасної науки, мають можливість демонструвати досліди на уроках, підвищувати рівень викладання. У свою чергу, учні вмотивовуються до навчання і застосування набутих знань та навичок, опановують нові методики справжніх досліджень, підвищують ерудицію, у них з'являється впевненість у собі.

Прикладом участі в програмі є виконана робота «Виділення ДНК з клітин рослин, тварин і грибів». За мету було поставлено довести, що проведений і описаний дослід з виділення ДНК з клітин рослин, тварин і грибів може бути включений до навчального плану 12 річної освіти і введений до змісту майбутнього програмно-методичного комплексу з біології для 11 класу, адже через доступну методику учні зможуть, використовуючи елементарне лабораторне обладнання, закріплювати здобуті на уроці знання на практиці.

Також необхідно зазначити, що незважаючи на одноразовість досліду, результати можна довгий час зберігати під шаром етанолу в пробірці і за потреби використовувати на інших предметах (хімія, фізика та ін.). Тож практичне значення роботи очевидне. Використання досліду можливе як у класах із поглибленим вивченням біології та хімії, так і в звичайних.

Історія дослідження ДНК

ДНК була відкрита Іоганном Фрідріхом Мішером у 1869 р. Спочатку нова речовина отримала назву нуклеїн, а пізніше, коли Мішер визначив, що ця речовина має кислотними властивостями, речовина отримала назву нуклеїнова кислота. Біологічна функція нововідкритої речовини була неясна, і довгий час ДНК вважалася запасником фосфору в організмі. Більш того, навіть на початку XX ст. багато біологів вважали, що ДНК не має ніякого відношення до передачі інформації, оскільки будова молекули, на їх думку, була дуже одноманітною і не могла містити закодовану інформацію.

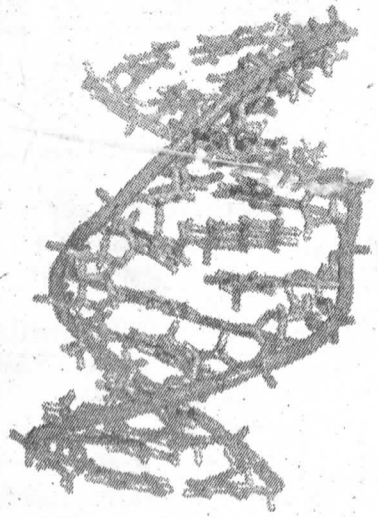
Поступово було доведено, що саме ДНК, а не білки, як вважалося раніше, є носієм генетичної інформації. Одними з перших вирішальних

р. з трансформації бактерій. Їм вдалося показати, що за так звану трансформацію (набування хвороботворних властивостей нешкідливою культурою в результаті додавання до неї мертвих хвороботворних бактерій) відповідає виділена з пневмококів ДНК. Експеримент американських учених Альфреда Хершу і Марти Чейз (1952 р.) із міченими радіоактивними ізотопами білками і ДНК бактеріофагів показали, що в заражену клітку передається тільки нуклеїнова кислота фага, а нове покоління фага містить такі ж білки і нуклеїнову кислоту, як і початковий фаг.

До 50-х років XX ст. точна будова ДНК, як і спосіб передачі спадкової інформації, залишалися невивченими. Було точно відомо, що ДНК складається з кількох ланцюжків, які у свою чергу складаються з нуклеотидів, але ніхто не знав, скільки цих ланцюжків і яким чином вони сполучені.

Структура подвійної спіралі ДНК була запропонована Френсісом Кріком і Джеймсом Уотсоном у 1953 р. на основі рентгеноструктурних даних, отриманих Морісом Вілкінсом і Розаліндою Франклін, і «правил Чаргаффа», згідно з якими в кожній молекулі ДНК дотримуються чіткі співвідношення, що зв'язують між собою кількість азотистих основ різних типів. Пізніше запропонована Уотсоном і Кріком модель будови ДНК була доведена, а їх робота відзначена Нобелівською премією з фізіології і медицини 1962 р. Серед нагороджених не було Розалінди Франклін, яка померла на той час (премія посмертно не присуджується).

У відомій доповіді 1957 р. Крік окреслив основи так званої «Центральної догми» молекулярної біології, яка передбачає взаємовідношення між ДНК, РНК і білками, та сформулював «адаптерну гіпотезу». Остаточне підтвердження механізму копіювання, запропонованого на основі спіральної структури, було отримане в 1958 р. Подальші роботи Кріка і його лабораторії показали, що генетичний код базується на трійках основ, що не перекриваються — кодонах. Це дозволило пізніше іншим вченим розшифрувати генетичний код. Ці відкриття — початок ери молекулярної біології.



З розвитком молекулярної біології було розроблено багато методів роботи з ДНК. Ці методи перш за все включають виділення ДНК, зазвичай за допомогою руйнування клітин, що містять необхідну ДНК, та спиртової преципітації ДНК з розчину. За потреби ДНК очищують за допомогою адсорбційної хроматографії. Більші кількості ДНК можна одержати за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), що вимагає тільки кількох молекул ДНК, але дозволяє ампліфікувати лише відносно невеликі ділянки ДНК або молекулярного клонування для ділянок більшої довжини.

Комплементарність подвійної спіралі означає, що інформація, якщо міститься в одному ланцюжку, міститься і в іншому ланцюжку. Оборотність і специфічність взаємодій між комплементарними парами основ важлива для реплікації ДНК і решти всіх функцій ДНК в живих організмах. Оскільки водневі зв'язки нековалентні, вони легко розриваються і відновлюються. Ланцюжки подвійної спіралі можуть розходитися як замок-змійка під дією ферментів або за високої температури. Різні пари основ утворюють різну кількість водневих зв'язків. A–T зв'язані двома, G–C — трьома водневими зв'язками, тому на розрив G–C потрібно більше енергії. Відсоток G–C пар і довжина молекули ДНК визначають кількість енергії, необхідної для дисоціації ланцюжків: довгі молекули ДНК з великим вмістом GC більш «тугоплавкі».

Отримана ДНК може бути проаналізована за допомогою рестрикційного аналізу, тобто розрізання ДНК на певних ділянках за допомогою рестриктаз, та розділення отриманих фрагментів за допомогою гелевого електрофорезу. У деяких випадках можливий одночасний аналіз цілих геномів, для чого використовуються ДНК- мікрочіпи, тобто матриці, на які нанесені флюоресцентно мічені комплементарні ДНК. Це дозволяє проведення порівняльної гібридизації геномів та аналіз рівня експресії багатьох генів одночасно.

Виділення ДНК проведять методом спиртової преципітації. **Спиртова преципітація** (англ. *Ethanol precipitation*) — метод, що використовується для очищення і концентрації ДНК. Молекула ДНК є полярною і легко розчиняється у воді. За принципом «розчинності в подібному», ДНК нерозчинна в неполярному етанолі, або навіть у суміші етанолу з водою, через зменшення кількості доступних молекул води.

ДНК спочатку преципітують (осаджують), додаючи великий об'єм 96 % етанолу (часто для збільшення ефективності преципітації розчин охолоджують на льоду або в морозильнику). Суспензія, що містить ДНК та солі, що зв'язані з нею йонними зв'язками, потім осаджується, центрифугується в мікроцентрифузі з коефіцієнтом вільного падіння ~12 тис. g, утворюючи осад ДНК. Далі осад ДНК промивають етанолом (ω = 70—80 %), центрифугують. Це дозволяє розчинити солі та значно зменшити їх концентрацію. Осаджену ДНК висушують у повітрі, зберігають під невеликим шаром спирту або ж у вакуумі. Замість етанолу використовують ізопропанол, ефективність преципітації якого дещо вища. Проте, ізопропанол менш леткий, ніж етанол, тому висушування ДНК займає більше часу.

Ми обрали трохи простішу методику виконання досліду порівняно з першоджерелом (науковим веб-сайтом). ДНК виділяли з досліджуваних матеріалів: банан, ківі (рослинні клітини), печінка (тваринна клітина), дріжджі (клітина грибів):

1. Підготували буфер — фізіологічний розчин, необхідний для утворення натрієвої солі (додавання солі сприяє зближенню ланцюгів подвійної спіралі ДНК і агрегації молекули).

2. Додали до проб по 3 мл детергенту (рідини для миття посуду «GALA») для руйнування клітин (детергент розчиняє ліпіди мембран, у тому числі ядерної мембрани, тим самим зумовлюючи перехід ДНК у розчин і спричиняє випадання її в осад.

3. Профільтрували через звичайну воронку з одного шару фільтрувального паперу, змоченого у воді. Фільтрат зібрали у пробірку.

Спирт осаджує ДНК, вона нерозчинна в етанолі. При додаванні спирту ДНК починає виділятись із суміші, тоді як решта компонентів суміші залишаються розчинними.

4. Отриманий осад ДНК зібрали за допомогою мікробіологічної пластикової піпетки (або зігнутої скріпки). Таким чином, через доступну методику проведення досліду виділення ДНК в шкільних умовах діти зможуть, використовуючи елементарне лабораторне обладнання, закріплювати здобуті на уроці знання на практиці.

Такі практичні досліди на уроках сприятимуть підвищенню інтересу до біології та хімії як до перспективних наук. Дітям дуже цікаво працювати над цими темами, а особливо сподобалося виконувати практичну частину роботи. Сподіваємось, що нові теоретичні знання і практичні навички стануть багатьом юним дослідникам у пригоді в майбутньому.

Список літератури

1. Айала Ф., Кайгер Дж. Современная генетика. Т. 2. — М.: Мир, 1988.
2. Б.Албертс, Д.Брей, Дж.Льюис, М.Рэфф, К.Робертс, Дж.Уотсон. Молекулярная биология клетки, 2-е издание, — М.: Мир, 1994.
3. Вікіпедія. Вільна українська Інтернет-енциклопедія.
4. Науково-методичний журнал «Біологія», № 3 (123). — Х.: Основа, 2006.
5. Промышленная микробиология /Под ред. Н. С. Егорова/. — М.: Высш. шк., 1989.
6. Скиба Ю. А., Скиба М.М. Науково-дослідна робота з біології та екології у середніх та вищих навчальних закладах. — К.: НПУ імені М.П. Драгоманова, 2007.
7. Шлегель Г. Общая микробиология. — М.: Мир, 1987.
8. http://evolution.atheism.ru/library/micro/index.html
9. http://www.n-t.org/tp/in/default.htm