


Ε.Κ.Φ.Ε. ΑΙΓΑΛΕΩ 	Προκριματικός διαγωνισμός για την 12th EUSO 2014 στην Βιολογία Σάββατο 7/12/2013
Όνοματεπώνυμο μελών ομάδας	1)..... 2)..... 3)..... Σχολείο:
1. Απομόνωση Νουκλεϊκών οξέων από φυτικά κύτταρα 2. Μικροσκοπική παρατήρηση στομάτων φύλλων, καταφρακτικών κυττάρων και χλωροπλαστών	
Διάρκεια: 1 ώρα	

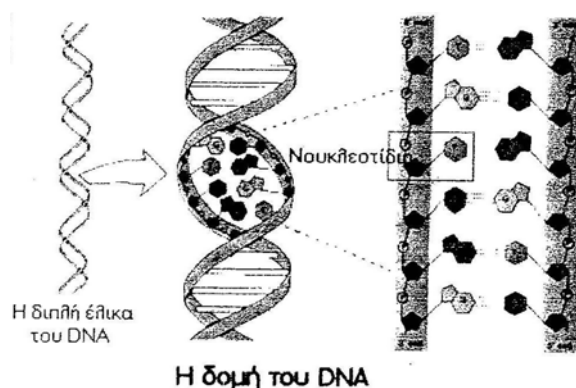
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ 1: Απομόνωση Νουκλεϊκών οξέων από φυτικά κύτταρα

Θεωρητικές επισημάνσεις

Το δεοξυριβονουκλεϊνικό οξύ (DNA) είναι πολυμερές απλούστερων χημικών ενώσεων, των νουκλεοτιδίων. Τα νουκλεοτίδια αποτελούνται από:

- ένα σάκχαρο με πέντε άτομα άνθρακα (δεοξυριβόζη)
- μια αζωτούχο βάση: αδενίνη (A) ή θυμίνη (T) ή κυτοσίνη (C) ή γουανίνη (G)
- μια φωσφορική ομάδα

Η σύνδεση των νουκλεοτιδίων πραγματοποιείται με τη δημιουργία ομοιοπολικού (φωσφοδιεστερικού) δεσμού μεταξύ της δεοξυριβόζης του ενός νουκλεοτιδίου και της φωσφορικής ομάδας του επόμενου με ταυτόχρονη απόσπαση ενός μορίου νερού. Η διαδοχική σύνδεση νουκλεοτιδίων οδηγεί στη δημιουργία πολυνουκλεοτιδικών αλυσίδων. Τα νουκλεοτίδια που απαρτίζουν το DNA περιέχουν δεοξυριβόζη και για αυτό ονομάζονται δεοξυριβονουκλεοτίδια. Για τον ίδιο λόγο το τελικό μόριο ονομάζεται δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ (DeoxyriboNucleic Acid – DNA).

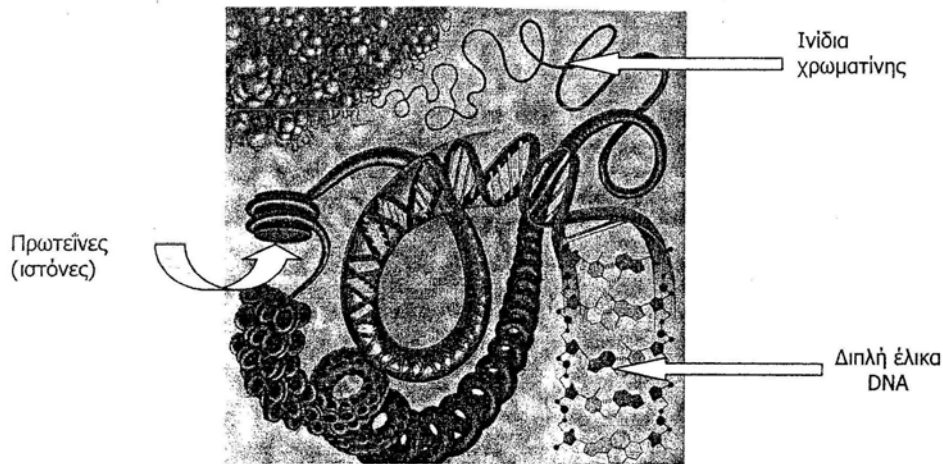


Εικ. 1 – Η δομή του DNA

Το DNA αποτελείται από δύο πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες, οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου που αναπτύσσονται μεταξύ των αζωτούχων βάσεων. Πιο συγκεκριμένα η αδενίνη (A) ενώνεται **μόνο** με τη θυμίνη (T) και αντίστροφα και η γουανίνη (G) **μόνο** με την κυτοσίνη (C) και αντίστροφα. Μεταξύ A και T σχηματίζονται δύο δεσμοί υδρογόνου, ενώ μεταξύ G και C σχηματίζονται τρεις δεσμοί υδρογόνου. Η τελική μορφή του μορίου DNA στο χώρο είναι η μορφή της διπλής έλικας (Εικ. 1). Η σύνδεση αυτή προσδίδει

ιδιαίτερη σταθερότητα στο DNA, γεγονός που εξυπηρετεί το βασικό του ρόλο ως γενετικό υλικό. Στην αλληλουχία των βάσεων των διαδοχικών νουκλεοτιδίων περιέχονται κωδικοποιημένες οι πληροφορίες για τη σύνθεση όλων των κυτταρικών συστατικών, δηλαδή αποτελεί τα σχέδια κατασκευής του οργανισμού.

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα το DNA βρίσκεται στον πυρήνα του κυττάρου ενωμένο (πακεταρισμένο) με πρωτεΐνες (ιστόνες και μη ιστόνες), με τη μορφή ινιδίων χρωματίνης (Εικ. 2). Επίσης, ένα μικρό ποσοστό του συνολικού DNA του κυττάρου περιέχεται στα μιτοχόνδρια και στους χλωροπλάστες και περιέχει τμήμα των πληροφοριών που είναι απαραίτητο για τις λειτουργίες τους.



Εικ. 2 – Το «πακετάρισμα» του DNA στον πυρήνα του ευκαρυωτικού κυττάρου

Οι δεοξυριβόζες και οι φωσφορικές ομάδες συνιστούν το σκελετό του μορίου που είναι υδρόφιλος. Οι υδρόφοβες αζωτούχες βάσεις βρίσκονται στο εσωτερικό του μορίου. Σε διάλυμα με υψηλή συγκέντρωση άλατος διασπώνται οι χημικοί δεσμοί (διαμοριακές αλληλεπιδράσεις) μεταξύ του DNA και των πρωτεϊνών (ιστονών), γεγονός που οδηγεί στην απελευθέρωση του DNA στο διάλυμα. Αυτό συμβαίνει αφού προηγηθεί μηχανικά καταστροφή του ιστού και των κυττάρων με συνέπεια την απελευθέρωση του περιεχομένου του πυρήνα στο διάλυμα.

Στη συγκεκριμένη εργαστηριακή άσκηση θα απομονώσετε DNA από μπανάνα και θα μπορέσετε να το παρατηρήσετε. Θα ομογενοποιήσετε κύτταρα μπανάνας απελευθερώνοντας συστατικά του κυττάρου όπως DNA, RNA, λιπίδια, ριβοσώματα καθώς και διάφορα μικρότερα μόρια. Στη συνέχεια θα κατακρημνίσετε το DNA με την προσθήκη αιθανόλης.

Σήμερα θα δείξετε τις ικανότητές σας και θα αξιολογηθείτε:

- για την ευχέρεια σας στην τέλεση πειραμάτων με απλά υλικά.
- Αν μπορείτε να διαπιστώσετε την χρησιμότητα των ενζύμων.
- Αν μπορείτε να διαπιστώσετε την χημική συμπεριφορά των μορίων.
- Αν μπορείτε να συσχετίσετε την απομόνωση νουκλεϊκών οξέων με την καθημερινότητα.
- Αν μπορείτε να διαπιστώσετε την ύπαρξη DNA στις τροφές σας.

Όργανα και υλικά απαραίτητα για το πείραμα

- 100g μπανάνα (περίπου μισή μπανάνα)
- Διάλυμα εκχύλισης DNA. (Για την παρασκευή διαλύματος εκχύλισης DNA, χρειαζόμαστε: 10ml απορρυπαντικού πιάτων, όχι συμπυκνωμένου (4 κουταλάκια), 5 g μαγειρικό αλάτι (2 κουταλάκια) και 100ml αποσταγμένο νερό)
- 10ml οινόπνευμα (αιθανόλη) παγωμένο (τοποθετούμε το μπουκαλάκι του οινοπνεύματος στην κατάψυξη, 24 ώρες πριν από τη διεξαγωγή του πειράματος)
- Υγρό φακών επαφής
- Σακουλάκι τύπου polybag
- Ένα μεγάλο χονί
- Ποτήρι ζέσεως 250ml
- Γυάλινη ράβδος ανάδευσης
- Δοκιμαστικοί σωλήνες
- Στήριγμα δοκιμαστικών σωλήνων
- Ορθοστάτης

- Σύνδεσμος απλός
- Δακτύλιος με στέλεχος
- Ένα τετράγωνο κομμάτι τούλι
- Φίλτρο του καφέ
- Πλαστικό κουταλάκι
- Μαχαίρι
- Ξύλινο καλαμάκι για σουβλάκι ή γυάλινη ράβδος ανάδευσης

Διεξαγωγή

1. Κόβουμε την μπανάνα σε μικρά κομμάτια, τα τοποθετούμε μέσα σε ένα σακουλάκι και τα πολτοποιούμε με το χέρι μας όσο το δυνατόν περισσότερο (μέχρι να γίνει σαν χυμός).
2. Φτιάχνουμε το διάλυμα εκχύλισης DNA: στο ποτήρι ζέσεως των 250ml βάζουμε τα 100ml νερού, τα 10ml απορρυπαντικού πιάτων και τα 5 g μαγειρικό αλάτι. Ανακατεύουμε προσεκτικά με την γυάλινη ράβδο μέχρι να διαλυθεί το αλάτι χωρίς να δημιουργηθεί αφρός.
3. Προσθέτουμε στο διάλυμα εκχύλισης του DNA την πολτοποιημένη μπανάνα και ανακατεύουμε προσεκτικά με την γυάλινη ράβδο, χωρίς να δημιουργηθεί αφρός, για δύο λεπτά.
4. Τοποθετούμε το χωνί μέσα σε ένα μεγάλο δοκιμαστικό σωλήνα και βάζουμε το τούλι μέσα στο χωνί.
5. Φιλτράρουμε το μίγμα, (με το διάλυμα εκχύλισης του DNA και της μπανάνας) στο τούλι και συλλέγουμε το διήθημα μέσα σε ένα μεγάλο δοκιμαστικό σωλήνα.
6. Φιλτράρουμε το διήθημα για δεύτερη φορά με φίλτρο του καφέ. Συλλέγουμε και πάλι το νέο διήθημα μέσα σε ένα μεγάλο δοκιμαστικό σωλήνα.
7. Προσθέτουμε 1 mL αποσταγμένο νερό και ανακατεύουμε καλά (το στάδιο 7 παραλείπεται αν το σχηματισμένο διάλυμα είναι αρκετά αραιό ή επαναλαμβάνεται μέχρι το σχηματισμένο διάλυμα να γίνει αραιό).
8. Από το διήθημα βάζουμε περίπου 2-3ml σε δύο μικρούς δοκιμαστικούς σωλήνες (1/4 του σωλήνα).
9. Προσθέτουμε 1-2 σταγόνες υγρού φακού επαφής σε κάθε μικρό δοκιμαστικό σωλήνα.
10. Αφήνουμε το διάλυμα να ηρεμήσει για 5min, τοποθετώντας τους σωλήνες στο στήριγμά τους.
11. Κρατώντας σταθερά το μικρό δοκιμαστικό σωλήνα γερμένο ελαφρά στο πλάι, προσθέτουμε σιγά – σιγά το παγωμένο οινόπνευμα με τρόπο ώστε να κυλάει απαλά στο τοίχωμα του δοκιμαστικού σωλήνα μέχρι να δημιουργηθεί πάνω από το διήθημα μια στοιβάδα οιοπνεύματος πάχους 2-3cm.



12. Τοποθετούμε το δοκιμαστικό σωλήνα στο στήριγμα, χωρίς να τον μετακινούμε για 2-3 λεπτά. Παρακολουθούμε την κατακρήμνιση των νουκλεϊκών οξέων (DNA + RNA) στο στρώμα της αλκοόλης. Μια λευκή ουσία, υπό μορφή νέφους, θα γίνει ορατή στη μεσόφαση όπου τα δύο υγρά επικοινωνούν.



13. Μπορούμε να μαζέψουμε το νέφος των νουκλεϊκών οξέων, που σχηματίζεται, με το ραβδάκι ή ένα καλαμάκι από σουβλάκι (βυθίζουμε το ραβδάκι μέσα στο οινόπνευμα και το περιστρέφουμε αργά ώστε να τυλιχτεί το νέφος των νουκλεϊκών οξέων γύρω από αυτό. **Μην ανακατέψετε.**)
14. Συμπληρώστε τις ερωτήσεις του Φύλλου Αξιολόγησης.



ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ 2: Μικροσκοπική παρατήρηση στομάτων φύλλων, καταφρακτικών κυττάρων και χλωροπλάστων

Θεωρητικές επισημάνσεις

Η παρατήρηση γίνεται στην επιδερμίδα διάφορων φύλλων. Προτιμώνται τα φύλλα στα οποία η επιδερμίδα ξεκολλάει, όταν τα σκίζουμε. Περισσότερα στόματα υπάρχουν, κατά κανόνα, στις κάτω επιφάνειες των φύλλων. Το φυτό που σας δίνεται για παρατήρηση είναι μπούζι.

Σε αυτή την πειραματική δραστηριότητα θα δείξετε τις ικανότητές σας και θα αξιολογηθείτε αν:

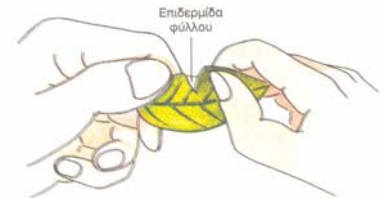
- μπορείτε να χρησιμοποιήσετε το μικροσκόπιο.
- Είστε σε θέση να παρασκευάσετε ένα φυτικό νωπό παρασκεύασμα.
- Μπορείτε να παρατηρήσετε και να σχεδιάσετε ένα στόμα της κάτω επιδερμίδας φύλλου, όπου θα διακρίνονται ευκρινώς τα καταφρακτικά κύτταρα και οι περιεχόμενοι σε αυτά χλωροπλάστες.

Όργανα και υλικά απαραίτητα για το πείραμα

- Φωτονικό Μικροσκόπιο
- Αντικειμενοφόροι πλάκες
- Καλυπτρίδες
- Λεπίδα ανατομίας - Ξυραφάκι
- Φύλλα από παχύφυλλο φυτό (μπούζι)
- Νερό
- Απορροφητικό χαρτί

Διεξαγωγή

1. Σκίζουμε το φύλλο, οπότε η επιδερμίδα ξεκολλάει.
2. Αφαιρούμε με προσοχή ένα μικρό κομμάτι από την κάτω επιδερμίδα του φύλλου και το τοποθετούμε το σε μία αντικειμενοφόρο πλάκα, αφού προηγουμένως την καθαρίσουμε από πράσινο-αδιαφανή ιστό του φύλλου που πιθανώς έχει απομείνει.
3. Σταζούμε μία σταγόνα νερό στο παρασκεύασμα. Ισιώνουμε το παρασκεύασμα αν έχει αναδιπλωθεί.
4. Τοποθετούμε την καλυπτρίδα, χωρίς να δημιουργηθούν φυσαλίδες αέρα.



5. Με απορροφητικό χαρτί αφαιρούμε το επιπλέον νερό που έχει βγει έξω από την καλυπτρίδα.



6. Παρατηρούμε το παρασκεύασμα στο μικροσκόπιο σε μικρή μεγέθυνση. Βάζουμε στο κέντρο του οπτικού πεδίου ένα στόμα και το παρατηρούμε.
7. Προχωρούμε στην επόμενη μεγέθυνση (x40) και παρατηρούμε το στόμα με δυνατότερο φωτισμό. Μέσα στα καταφρακτικά κύτταρα διακρίνονται πράσινοι σχηματισμοί, οι χλωροπλάστες.
8. Συμπληρώστε το Φύλλο Αξιολόγησης.



ΦΥΛΛΟ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ

Πειραματική δραστηριότητα 1

1. Για ποιο λόγο πολτοποιούμε και μετά φιλτράρουμε το δείγμα;

.....
.....
.....

2. Τα ένζυμα που χρησιμοποιούμε διασπούν πρωτεΐνες. Γιατί προσθέσαμε αυτά τα ένζυμα στο μείγμα;

.....
.....
.....

3. Τα νουκλεϊκά οξέα που παρατηρήσατε σε ποιόν οργανισμό ανήκουν;

.....
.....
.....

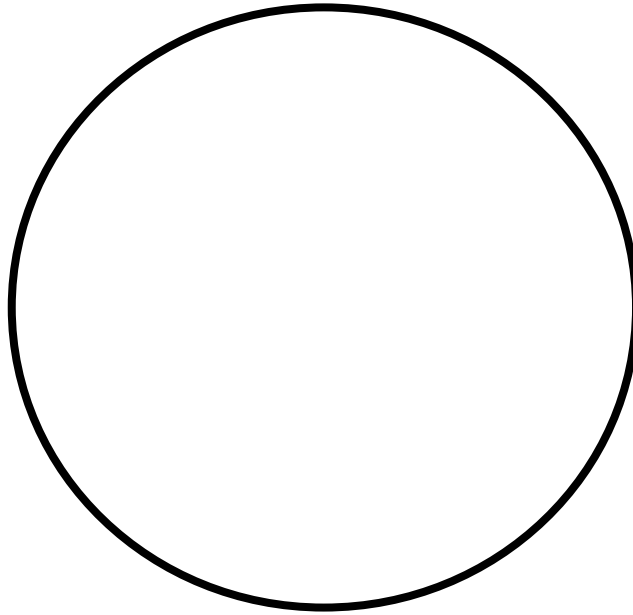
4. Να ονομάσετε τα νουκλεϊκά οξέα που εμφανίζονται στην επιφάνεια επαφής διαλύματος – αλκοόλης.

.....
.....
.....

ΦΥΛΛΟ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ

Πειραματική δραστηριότητα 2

1. Σχεδιάστε ένα στόμα της επιδερμίδας σε μεγέθυνση X400 και με κατάλληλες ενδείξεις (βελάκια) να δείξετε τα καταφρακτικά κύτταρα και δύο χλωροπλάστες.



2. Ποιος νομίζετε ότι είναι ο ρόλος των στομάτων των φύλλων;

.....

.....

.....

Καλή επιτυχία!!!

**Προκριματικός διαγωνισμός για την 12th EUSO 2014
στην Βιολογία**

Ομάδα:

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ 1 (50 ΜΟΝΑΔΕΣ)

1. Οργάνωση ομάδας (10 μονάδες)	
2. Διαδικασία εκτέλεσης του πειράματος (10 μονάδες)	
3. Αποτελέσματα (σχηματισμός νέφους DNA) (10 μονάδες)	
4. Φύλλο εργασίας (4X5=20 μονάδες)	

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ 2 (50 ΜΟΝΑΔΕΣ)

1. Τομή φύλλου (3 μονάδες)
2. Παραλαβή επιδερμίδας (3 μονάδες)
3. Τοποθέτηση υλικού στην αντικειμενοφόρο (3 μονάδες)
4. Τοποθέτηση καλυπτρίδας (3 μονάδες)
5. Άνοιγμα μικροσκοπίου (φωτισμός, επιλογή του μικρότερου φακού) (3 μονάδες)
6. Τοποθέτηση παρασκευάσματος (3 μονάδες)
7. Εστίαση (3 μονάδες)
8. Εναλλαγή φακών (3 μονάδες)
9. Ικανότητα αναζήτησης (3 μονάδες)
10. Απομάκρυνση παρασκευάσματος (3 μονάδες)
11. Φύλλο εργασίας (20 μονάδες)

ΣΥΝΟΛΟ (100 μονάδες):