

»55. srečanje mladih raziskovalcev Slovenije 2021«

**IZDELAVA CENOVNO UGODNE ELEKTROFOREZE ZA
LOČEVANJE UMETNIH BARVIL V ŽIVILIH**

Raziskovalno področje: Aplikativni inovacijski predlogi in projekti (BIOLOGIJA)

Avtorici: Nika Makuc in Maša Mesarič

Mentorici: Katja Holnthaner Zorec in Tamara Šiško

Šola: II. gimnazija Maribor

Maribor, marec 2021

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	5
ZAHVALA	6
1 UVOD	7
1.1 Elektroforeza	8
1.2 Agarozna gelska elektroforeza nukleinskih kislin	8
1.3 Barvila v živilih	9
2 METODOLOGIJA DELA	13
2.1 Postopek prave elektroforeze	13
2.2 Postopek za pripravo doma narejene elektroforeze	17
2.2.1 Izvedba postopka - prvi poskus	18
2.2.2 Izvedba postopka - drugi poskus	20
2.2.3 Izvedba postopka - tretji poskus	21
3 REZULTATI	23
3.1. Vaja za dijake	24
4 RAZPRAVA	31
4.1 Izračun stroškov profesionalne elektroforeze	32
4.2 Izračun stroškov doma narejene elektroforeze	33
4.3 Stroški za ostali material	34
4.4 Možni viri napak	35
4.5. Umestitev vaje v učni načrt	36
5 ZAKLJUČEK	38
6 DRUŽBENA ODGOVORNOST	39
7 VIRI IN LITERATURA	40

KAZALO SLIK

Slika 1: Molekulska formula barvila E102 (PubChem, 2021).....	11
Slika 2: Molekulska formula barvila E104 (PubChem, 2021).....	11
Slika 3: Molekulska formula barvila E129 (PubChem, 2021).....	11
Slika 4 Molekulska formula barvila E132 (PubChem, 2021).....	12
Slika 5: Molekulska formula barvila E133 (PubChem, 2021).....	12
Slika 6: Molekulska formula barvila E153 (Matan, 2017)	12
Slika 7: Mešanice barv (lasten vir)	15
Slika 8: Komora za elektroforezo priklopljena na vir napetosti (lasten vir).....	15
Slika 9: Komora za elektroforezo z barvili (lasten vir).....	16
Slika 10: Z elektroforezo ločena barvila (lasten vir)	16
Slika 11: Nastavitev bakrenih žic v posodi (lasten vir)	18
Slika 12: Namestitev glavnika iz kartona v posodi (lasten vir)	18
Slika 13: Povezava baterij s posodo z agarjem (lasten vir)	19
Slika 14: Prikaz barvil po nanosu v luknjice (lasten vir).....	19
Slika 15 Rezultat prvega poskusa - barvila so razlita po pufu (lasten vir).....	19
Slika 18: Tretji poskus (lasten vir).....	21
Slika 19: Barvne lise tretjega poskusa (lasten vir).....	21
Slika 20: Barvne lise četrtega poskusa (lasten vir)	21

KAZALO SLIK IZ VAJE ZA DIJAKE

Slika 1: Postavitev žic v posodi (lasten vir)	
Slika 2: Vezava baterij (lasten vir)	
Slika 3: Glavnik s petimi zobci (lasten vir)	
Slika 4: Namestitev glavnika v posodo z gelom iz agaroze (lasten vir)	
Slika 5: Komora za elektroforezo z barvili priključena na enosmeren električni tok (lasten vir)	
Slika 6: Molekulska formula barvila E104 - Kinolinsko rumeno (PubChem, 2021)	
Slika 7: Molekulska formula barvila E133 - Brilljantno modra (PubChem, 2021)	
Slika 8: Molekulska formula barvila E129 - Allura rdeče (PubChem, 2021)	
Slika 9: Rezultati gelske elektroforeze DNA (Course Hero, 2021)	

KAZALO TABEL

Tabela 1: Razdalja barvnih lis pri tretjem in četrtem poskusu.....	23
Tabela 2: Seznam in cena opreme za profesionalno elektroforezo.....	32
Tabela 3: Seznam in cena opreme za doma narejeno elektroforezo	33
Tabela 4: Cena materiala za elektroforezo.....	34

POVZETEK

Gelska elektroforeza je metoda, ki se uporablja za ločevanje molekul DNA glede na njihovo velikost. Izvedba metode je v srednji šoli zahtevna zaradi drage opreme in nevarnih barvil. V inovacijskem predlogu bomo predstavili načrt za izdelavo enostavne in cenovno ugodne elektroforeze, ki jo bomo uporabili za ločevanje umetnih barvil v živilih. Barvila (tartrazin, azorubin...) zaradi negativnega naboja potujejo v enako smer kot DNA, zaradi različne velikosti pa je hitrost njihovega potovanja različna. Zato jih lahko uporabimo kot model za lažje razumevanje principa ločevanja na podlagi naboja in velikosti. Raziskave kažejo, da stopnja motivacije pada z naraščanjem učenja abstraktnih vsebin, zato upamo, da bomo z didaktičnim pripomočkom, ki ga je možno izdelati tudi v domači kuhinji, motivirali dijake in olajšali razumevanje zahtevnih tehnik molekulske genetike.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujeva najinima mentoricama za vso pomoč in spodbudo pri raziskovalnem delu. Prejeli sva veliko novega znanja in izkušenj. Ob oblikovanju inovacijskega predloga naju je delo na področju molekulske genetike še bolj pritegnilo.

1 UVOD

V mnogih kriminalnih filmih in nadaljevankah lahko pogosto zasledimo forenzike, ki si pri iskanju osumljenцев pomagajo z DNA¹, najdeno na kraju zločina. Molekule DNA v laboratoriju s pomočjo gelske elektroforeze ločijo glede na njihovo velikost in na podlagi dobljenih pasov ločenih molekul primerjajo osumljenčevo DNA s tisto, ki so jo našli na kraju zločina (Surat, 2018). Gre za postopek, ki ni le v filmskem, ampak tudi v resničnem svetu rešil mnogo kaznivih dejanj in soočil krivca s posledicami ali pa je obtoženega rešil krivde. Metoda gelske elektroforeze je ena izmed metod molekulske genetike, katerih razumevanje se je v današnjem času, ko se svet sooča s "korona" krizo, izkazalo za zelo pomembno tudi v vsakdanjem življenju.

Kljub temu, da je razumevanje metode gelske elektroforeze vključeno v naše vsakdanje življenje, mnogi metode ne poznajo, četudi jo lahko s pomočjo pravih pripomočkov izvedemo tudi v šoli ali doma.

Ker srednje šole zaradi drage opreme (set za elektroforezo, napajalnik, transiluminator²) in nevarnih barvil, s katerim moramo obarvati sicer brezbarvne molekule DNA (npr. etidijev bromid), to metodo predstavljajo dijakom večinoma le teoretično, bomo v inovacijskem predlogu predstavili načrt za izdelavo enostavne in cenovno ugodne gelske elektroforeze, ki jo bomo uporabili za ločevanje umetnih barvil. S prostim očesom vidna barvila (E102 - tartrazin, E132 - indigotin...) zaradi negativnega naboja potujejo v enako smer kot DNA, hkrati pa je zaradi različne velikosti molekul hitrost njihovega potovanja skozi gel različna. Lahko jih uporabimo kot model za lažje razumevanje principa ločevanja molekul na podlagi naboja in velikosti, ter hkrati tudi za prikaz same metode gelske elektroforeze. Pripravili smo tudi navodila, ki jih bodo učitelji in dijaki lahko uporabili pri izvedbi vaje v šoli. Idejo za delo smo dobili na ameriški spletni strani *Science buddies*, ki z idejami in predlogi za delo spodbuja učence in dijake k raziskovanju na področju naravoslovja (www.sciencebuddies.org).

Številne raziskave kažejo, da stopnja motivacije dijakov upada z naraščanjem učenja abstraktnih in zahtevnejših vsebin, zato upamo, da bomo z didaktičnim pripomočkom, ki ga je možno izdelati tudi v domači kuhinji ali slabše opremljenem šolskem laboratoriju, motivirali dijake in jim olajšali razumevanje zahtevnejših tehnik molekulske genetike.

¹ Deoksiribonukleinska kislina

² Del opreme, ki se uporablja v laboratorijih za vizualizacijo ciljnih DNA in proteinov (Labcompare, 2021)

1.1 Elektroforeza

Elektroforeza je separacijska tehnika, pomembna na področju klinične diagnostike in forenzike, ki temelji na potovanju nabitih delcev v električnem polju. Je metoda za ločevanje molekul, kot so aminokisliline, proteini, nukleotidi, nukleinske kisline in druge nabite molekule (barvila). Osnova za izvedbo je elektroforetska komora in želatinasta podlaga (zamrežen medij), ki je lahko agarozna (ločevanje DNA) ali poliakrilamid (ločevanje proteinov). Vzorci se nanesejo v gel iz agaroze, z elektrodami in virom napetosti se v komori ustvari električno polje, kar povzroči, da se negativno nabite molekule premikajo proti pozitivni elektrodi. Manjše molekule potujejo skozi pore v gelu hitreje kot večje in tako se fragmenti ločijo glede na velikost (Rozman, 2013).

1.2 Agarozna gelska elektroforeza nukleinskih kislin

Gelska elektroforeza se običajno uporablja za ločevanje molekul DNA ali RNA³, iz mešanice različno dolgih fragmentov ločimo fragmente po dolžini. Zelo pomembna je v forenziki, za ugotavljanje identitete posameznikov, ki so bili vpleteni v zločin, s povezovanjem DNA vzorca s tistim vzorcem, ki je v bazi podatkov (Christopher, 2020).

DNA postane v vodnem okolju zaradi fosfatnih skupin negativno nabita, zato pod vplivom električnega toka potuje proti pozitivno nabiti elektrodi (anodi). Po nanosu vzorca DNA na gel iz agarja potujejo manjši fragmenti hitreje, večji počasneje. Dolžino fragmenta lahko določimo s primerjavo med dolžino testnega fragmenta in dolžino referenčnega fragmenta, katerega dolžino poznamo (Brajkovič, 2006).

Ker se fragmenti v samem gelu ne vidijo, se vizualizacija DNA v gelu omogoči z obarvanjem s fluorescentnimi barvili, ki se vrinejo med bazne pare, na primer etidijev bromid. Ker je ta izredno strupen (mutagen), se gelska elektroforeza DNA v šolah ne izvaja demonstracijsko (Klenar, 2015).

Mobilnost v električnem polju je odvisna od velikosti in oblike: večje molekule potujejo počasneje. Krožna DNA se premika hitreje od linearne DNA enake velikosti (Rozman, 2013). Na mobilnost prav tako vpliva lastnost vzorca - večji kot je naboj iona, hitreje potuje, saj omogoča večjo električno silo, naboj funkcionalnih skupin pa je odvisen od pH pufra. Na mobilnost ionov vplivajo napetost, upornost medija in jakost električnega toka. Hitrost

³ Ribonukleinska kislina

potovanja molekul je sorazmerna velikosti toka oz. napetosti. Če je jakost toka prevelika, se sprošča energija v obliki toplote, kar lahko povzroči segrevanje in denaturiranje vzorca, kar pa se lahko prepreči z ohlajanjem elektroforetske komore. PH pufra ima vpliv na ionizacijo kislin in baz. Zelo velik vpliv ima tudi na gibljivost snovi, saj se njihov naboj spreminja glede na pH. Nosilci kot so agarosa in poliakrilamid, delujejo kot molekularna sita, ki upočasnijo prehod večjih molekul. Večja kot je zamreženost gela, počasnejše je potovanje molekule skozi nosilec (Klenar, 2015).

1.3 Barvila v živilih

Aditivi so snovi, ki se ne uživajo kot samostojno živilo, vendar so dodani živilom med postopki predelave, obdelave, transporta ali pri hrambi, z namenom izboljšanja njihove varnosti oz. kakovosti. Gre za snovi, ki v živilu niso naravno prisotne, temveč so mu dodane. Njihov glavni namen je podaljševanje obstojnosti, ohranjanje kakovosti, obstojnosti okusa in vonja, izboljšanje izgleda ter tudi zmanjšanje nevarnosti za zdravje pri zaužitju. V živilih se pri nas kot aditivi najpogosteje pojavljajo emulgatorji, stabilizatorji, barvila, konzervansi, sredstva za uravnavanje kislosti, antioksidanti in kisline (Inštitut za nutricionistiko, 2016).

Proizvajalci hrane in pijače smejo uporabljati le odobrene aditive, pri čemer za različne vrste aditivov veljajo tudi različne omejitve. Odobrenim aditivom so predpisana identifikacijska števila E, katerih označevanje je razvila Evropska gospodarska skupnost. Ob odobritvi posameznega aditiva, se ta vpiše v register s črko E, ki ji sledi trimestna številka. S številom E je registriranih približno 340 aditivov. Uporabo aditiva mora proizvajalec obvezno označiti na živilu med sestavinami živila s polnim imenom ali z E številom (Inštitut za nutricionistiko, 2016).

Odobreni aditivi so varni za uporabo, če so uporabljeni v predpisanih količinah. Nekateri aditivi so v višjih koncentracijah lahko škodljivi za zdravje ljudi, zato so zanje določene »najvišje dovoljene vsebnosti«. Najvišja dovoljena vsebnost aditiva je podana v mg/kg živila, najpogosteje pa se meje gibljejo med 10 mg/kg (0,001%) in 1 g/kg (0,1%) izdelka. Najvišje dovoljene vsebnosti so v živilih postavljene tako, da je ob uravnoveženi in pestri prehrani preseganje sprejemljivega dnevnega vnosa malo verjetno. Sprejemljivi dnevni vnos je količina aditiva, ki jo lahko dnevno zaužije posameznik brez večjega tveganja za zdravje (Inštitut za nutricionistiko, 2016).

V Evropski uniji je za uporabo v živilih odobrenih okoli 40 barvil. Označena so s funkcijskim razredom »barvilo«, ki mu sledi ime barvila ali E številka od 100 do 180. Uporabljajo se za privlačnejšo vizualno podobo živila, za obarvanje brezbarvnih živil in za povrnitev prvotnega videza živila (Inštitut za nutricionistiko, 2016). Nikakor pa ne sme barva za živilo zavajati potrošnika, kot na primer dajati vtisa, da živilo vsebuje sestavino, ki živilu pri proizvodnji ni bila dodana (NIJZ, 2016).

Barvila so lahko umetnega ali naravnega izvora, kot so barvila rastlinskega in živalskega izvora. Uporabljajo pa se lahko le odobrena barvila, ki jih je na osnovi znanstvene ocene varnosti odobrila Evropska komisija (Inštitut za nutricionistiko, 2016).

Barvila za živila najpogosteje najdemo v slaščičarskih izdelkih, bonbonih, brezalkoholnih aromatiziranih pijačah, mlečnih izdelkih, sladoledu, ribjih in morskih izdelkih, prehranskih dopolnilih in prigrizkih na osnovi žit in škroba (NIJZ, 2013).

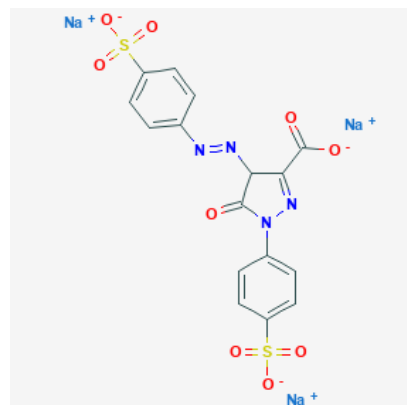
V mnogih izdelkih pa je uporaba barvil prepovedana. To je v nepredelanih živilih kot je sveže sadje ali zelenjava, ustekleničenih in predpakiranih vodah, mleku, oljih in masteh živalskega ali rastlinskega izvora, jajcih in jajčnih izdelkih, moki, testeninah, sladkorjih, sadnih in zelenjavnih sokovih, marmeladah, čokoladnih izdelkih, kavah, čajih, soli in vinu. Prav tako uporaba barvil za živila ni dovoljena v hrani za dojenčke in majhne otroke (NIJZ, 2013).

V nadaljevanju se bomo osredotočili le na barvila, ki smo jih uporabili za izvedbo gelske elektroforeze. Ta barvila so tartrazin (E102), kinolinsko rumeno (E104), allura rdeče (E129), indigotin (E132), briljantno modra (E133) in rastlinski ogljik (E153).

E102 - Tartrazin

Tartrazin je rumeno-oranžno sintetično barvilo, ki se najpogosteje uporablja v brezalkoholnih osvežilnih pijačah, slaščicah, jogurtih, trdih bonbonih, sladoledih, kosmičih, mesnih izdelkih, omakah ter konzervirani in pakirani hrani (More, 2020).

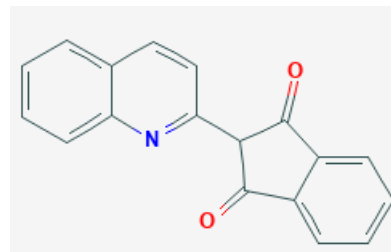
Raziskave kažejo, da uživanje hrane, obarvane s tem barvilom, lahko povzroči določene alergijske reakcije, kot so izpuščaji na koži, zatečenost ustnic, jezika, grla in vratu, pa tudi dermatitis, astmatične simptome ali alergijski nahod (NIJZ, 2013).



Slika 1: Molekulska formula barvila E102 (PubChem, 2021)

E104 - Kinolinsko rumeno

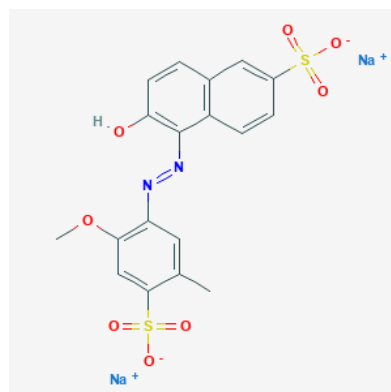
Kinolinsko rumeno je sintetično barvilo rumene barve, ki se večinoma uporablja skupaj z drugimi rumenimi barvili v slaščicah, pekovskih izdelkih, morski hrani, mesnih izdelkih, prigrizkih, maščobah, oljih, začimbah in konzervirani hrani (Rademaker, 2003).



Slika 2: Molekulska formula barvila E104 (PubChem, 2021)

E129 - Allura rdeče

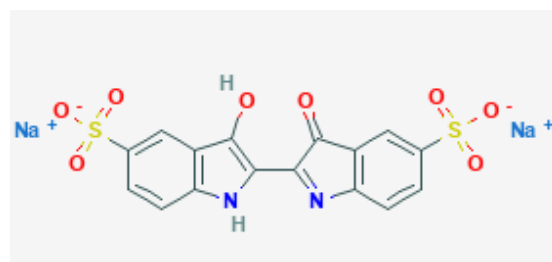
Allura rdeče je oranžno rdeče barvilo, ki se uporablja v žitaricah, pijačah, želatinah, pudingih, mlečnih izdelkih, zamrznjenih izdelkih, mešanica v prahu, glazurah, začimbah, prelivih, omakah, pecivu in slaščicah. Nekatere raziskave kažejo, da ima barvilo allura rdeče škodljive učinke na zdravje ljudi, povezane z alergijami, rakom, multiplo sklerozo, motnjo hiperaktivnosti s pomanjkanjem pozornosti, poškodbami možganov, slabostjo, srčnimi boleznimi in astmo (Kobun, 2016).



Slika 3: Molekulska formula barvila E129 (PubChem, 2021)

E132 - Indigotin

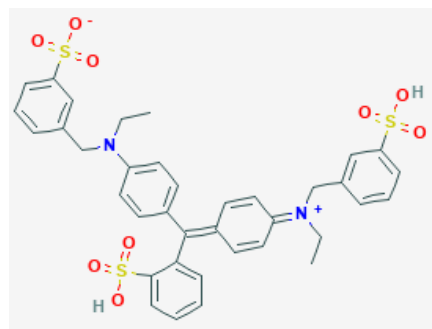
Indigotin je modro sintetično barvilo, ki ga dodajajo predvsem omakam, žitaricam, slaščicam, čokoladi, mlečnim izdelkom, okraskom za peko, žvečilnim gumijem, zamrznjeni hrani, začimbam in mesnim izdelkom (Rademaker, 2003).



Slika 4 Molekulska formula barvila E132 (PubChem, 2021)

E133 - Briljantno modra

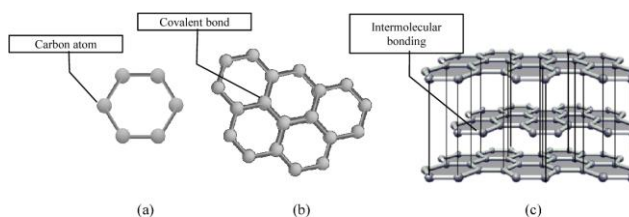
Briljantno modra je modro sintetično barvilo, ki se pogosto uporablja skupaj z tartrazinom (E102), da se živilo obarva zeleno. Najpogosteje se dodaja slaščicam, pijačam, žitaricam, zamrznjenim mlečnim sladicam, piškotom, žvečilnim gumijem in prigrizkom z okusom slanine (Rademaker, 2003).



Slika 5: Molekulska formula barvila E133 (PubChem, 2021)

E153 - Rastlinski ogljik

Rastlinski ogljik je naravna črna barva, ki se pridobiva iz zgorelega rastlinskega materiala ali pa se proizvaja (Rademaker, 2003). Dodaja se koncentriranim sadnim sokovom, slaščicam, marmeladam, sladoledom, konzervirani hrani in želejem.



Slika 6: Molekulska formula barvila E153 (Matan, 2017)

Večinoma se ne uporablja kot samostojno barvilo, saj daje močno črno barvo, temveč v kombinaciji z drugimi barvili, za potemnitev njihovega odtenka (IACM, 2021).

2 METODOLOGIJA DELA

Najprej smo izvedli elektroforezo v šolskem laboratoriju z opremo in materialom, ki se uporablja za gelsko elektroforezo DNA fragmentov. Tako smo preizkusili, če umetna barvila, ki smo jih nabavili, sploh potujejo po agarozni in jih lahko uporabimo za naš namen. Preverili smo tudi, če so negativno nabita in potujejo od negativnega proti pozitivnemu polu. Nabitost teh molekul je odvisna od njihove izoelektrične točke⁴ pri določenem pH, ki je pomemben pri elektroforezi. V nevtralnem bi barvila z negativnim nabojem potovala od pozitivnega proti negativnemu polu.

2.1 Postopek prave elektroforeze

Pripomočki:

- Komora za elektroforezo (ThermoScientific, Owl™ Easycast™)
- Glavnik za elektroforezo
- Pladenj za gel iz agaroze
- Vir napetosti (300 V) (ThermoScientific, Owl™)
- Tehnica (Kern)
- Merilni valj (150 ml)
- Erlenmajerica (250 ml)
- 7 manjših čaš (50 ml)
- 8 steklenih palčk
- Plastična žlička, spatula
- Pasteurjeva kapalka
- Avtomatska pipeta (Transferpipette S, 1-10 µL) in LLG pipeta 10-100 µL)
- Mikrovalovna pečica (Gorenje)
- TAE pufer
- Agarozna (Sigma Aldrich)
- 85 % glicerol
- Barvila:
 - E102 - Tartrazin (Fun Cakes)
 - E104 - Kinolinsko rumeno (Rainbow Dust Colours Ltd)

⁴ Vrednost neto naboja, ki je pri določenem pH enaka nič (Eucbeniki.sio.si, 2016)

- E129 - Allura rdeče (Lesepidado)
- E132 - Indigotin (Fun Cakes)
- E133 - Briljantno modra (Lesepidado)
- E153 - Rastlinsko oglje (Fun Cakes)

Zaščita

- Zaščitni plašč
- Zaščitne rokavice
- Zaščitna očala

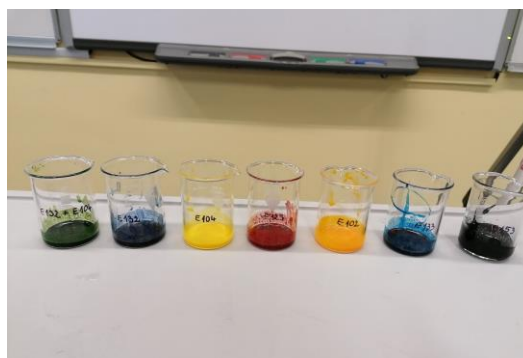
POSTOPEK

Na tehtnici smo odtehtali 1,5 g agaroze in jo vsuli v erlenmajerico. V erlenmajerico smo dodali 150 ml 1×TAE pufra in ga zmešali s stekleno palčko. Erlenmajerico smo dali v mikrovalovno pečico, kjer smo jo segrevali 1 do 3 minute dokler agarozna ni bila popolnoma raztopljena. Pazili smo, da gela iz agaroze nismo pregreli, saj bi lahko v tem primeru prišlo do izhlapevanja pufra in s tem do povečanja koncentracije agaroze. Med segrevanjem smo raztopino približno vsakih 30-45 sekund premešali. S segrevanjem raztopine smo končali, ko se je agarozna popolnoma raztopila in je raztopina rahlo zavrela (na površini so bili vidni mehurčki/pena, raztopina je bila popolnoma transparentna). Erlenmajerico smo vzeli iz mikrovalovne pečice in jo pustili približno 5 min na sobni temperaturi, da se je ohladila na 50°C. Biti smo morali previdni, da se raztopina ni ohladila preveč, saj je v tem primeru ne bi mogli vliti v pladenj za gel, ki smo ga predhodno dali v komoro za elektroforezo (merilo za ustrezno temperaturo so lahko naše roke) (Addgene, 2018).

Ko se je raztopina ohladila na 50°C, smo jo vlili v model za gel, ki je moral biti pravilno obrnjen. Prostor, kamor smo vlili gel, je moral biti iz vseh strani zaprt (razen od zgoraj, kjer smo vlili raztopino v model). To smo storili počasi, da smo se izognili nezaželenim mehurčkom, ki bi lahko ovirali potovanje barvil. V nalito raztopino smo vstavili glavnik za elektroforezo, ki je po strditvi gela pustil luknje, v katere smo kasneje nanegli vzorce barvila. Gel smo pustili stati 20-30 min, dokler ni bil povsem strjen in ohlajen. Ko se je gel strdil, smo odstranili glavnik za elektroforezo in pladenj za gel vzeli iz komore. Pladenj z gelom smo pravilno obrnili, tako da so bile luknje, ki so nastale zaradi glavnika, vzporedne s krajšim robom komore za elektroforezo. Nato smo gel počasi prelili s 150 ml istega pufra, ki smo ga na začetku primešali

agaroz. Pufer smo vliвали v komoro za elektroforezo, dokler ni bil s pufrom prekrit celoten gel (Addgene, 2018).

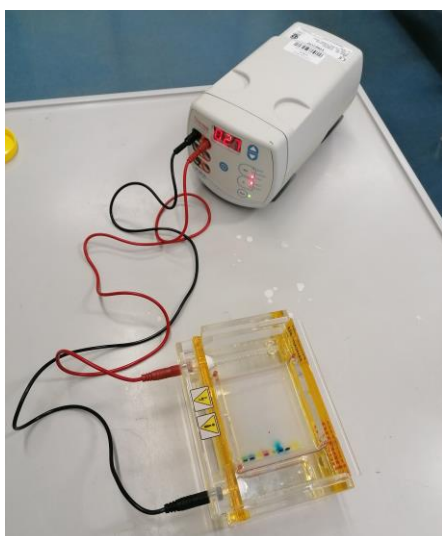
V manjše čaše smo odtehtali 0,003 g barvila tako, da smo v vsako čašo dali eno barvilo, v eni pa smo naredili mešanico barvil (v našem primeru je to bila mešanica barvil E104 in E132). Nato smo v vsako čašo s pomočjo kapalke dodali 1 ml 85 % glicerola. Mešanico barvila in glicerola smo dobro premešali, da se je barvilo v celoti raztopilo in ni bilo več prisotnih grudic. Raztopljena barvila smo s



Slika 7: Mešanice barv (lasten vir)

pomočjo avtomatske pipete nanесли v luknje, ki jih je pustil glavnik za elektroforezo v gelu iz agaroze. Konico avtomatske pipete, v katero smo odpipetirali raztopino posameznega barvila, smo potisnili v notranjost luknje, ki smo jo do $\frac{3}{4}$ počasi napolnili in pazili, da se raztopina barvila ni razlila po površini pufra. Na takšen način smo napolnili luknje z vsemi barvili.

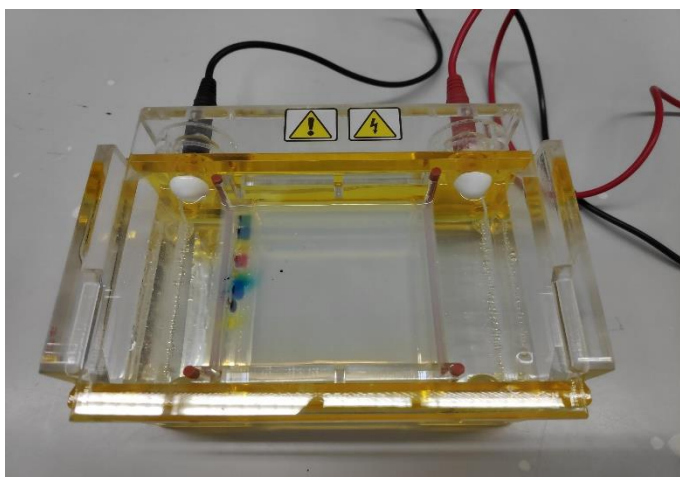
Komoro za elektroforezo smo zaprli in hkrati nanjo priključili vir napetosti. Pazili smo, da je bila negativna elektroda bližje luknjam z barvili, saj ta zaradi negativne nabitosti potuje proti pozitivni elektrodi. Vir napetosti smo nastavili na 100 V in s pritiskom na tipko »Run« spustili električni tok skozi komoro. Vir napetosti smo pustili prižgan približno 45 min oziroma dokler barvna sled ni obsegala 75-85 % dolžine gela iz agaroze.



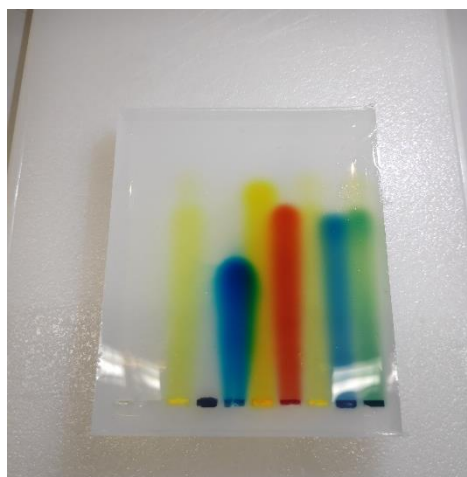
Slika 8: Komora za elektroforezo priklopljena na vir napetosti (lasten vir)

Po pretečenem času smo izklopili vir napetosti in odstranili elektrode. Gel smo previdno vzeli iz komore in ga položili na desko. Z ravnilom smo izmerili posamezne razdalje med mestom nanosa (luknjico) in koncem barvne sledi ter na podlagi razlik v dolžinah primerjali velikosti molekul posameznega barvila in njihovo nabitost.

Gelska elektroforeza je uspela, saj smo uspešno dokazali, da so barvila negativno nabita in potujejo po agarozu od negativnega proti pozitivnemu polu. Po agarozu so nastale dobro vidne barvne lise, ki so kazale, do kod so molekule barvila potovale. Pomanjkljivost, ki smo jo opazili je bila ta, da smo v luknje spustili preveliko količino barvila.



Slika 9: Komora za elektroforezo z barvili (lasten vir)



Slika 10: Z elektroforezo ločena barvila (lasten vir)

Nato smo se lotili priprave gelske elektroforeze, sestavljene iz materiala, ki je na voljo v običajnih trgovinah in je cenovno ugoden. Za osnovo in izvedbo prvega poskusa smo priredili navodila iz spletne strani Science Buddies, ki so dostopna na povezavi: https://www.sciencebuddies.org/science-fair-projects/project-ideas/BioChem_p028/biotechnology-techniques/forensic-science-building-your-own-tool-for-identifying-dna#procedure.

2.2 Postopek za pripravo doma narejene elektroforeze

MATERIAL

Komora za elektroforezo:

- 2 plastični posodi različnih velikosti
- Bakrena žica
- Klešče za rezanje žice
- 9-voltne baterije (10)
- Kabli s krokodilčki (2)
- Kos kartona/tanke plastike (npr. pokrov od embalaže sladoleda)
- tapetniški nož

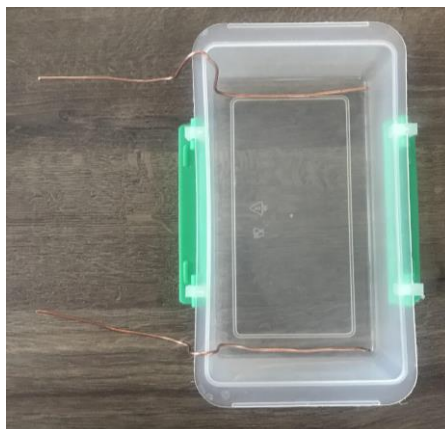
Pripomočki:

- Kuhinjska tehtnica (Kern)
- Merilni valj (150 ml)
- Posoda za mešanje
- Soda bikarbona
- Deionizirana voda
- Jedilni agar v prahu (Pekis)
- Mikrovalovna pečica (Gorenje)
- Nož
- 7 manjših čaš (50 ml)
- 8 steklenih palčk
- Plastična žlička, spatula
- Plastična kapalka
- Ravnilo
- 85 % glicerol
- Barvila:
 - E102 - Tartrazin (Fun Cakes)
 - E104 - Kinolinsko rumeno (Rainbow Dust Colours Ltd)
 - E129 - Allura rdeče (Lesepidado)
 - E132 - Indigotin (Fun Cakes)
 - E133 - Briljantno modra (Lesepidado)
 - E153 - Rastlinsko oglje (Fun Cakes)

2.2.1 Izvedba postopka - prvi poskus

Žico smo razrezali na dva enaka dela, ki smo ju oblikovali v kaveljčka. Dolga sta bila toliko, da sta gledala iz posode tako, da so se lahko nanju pritrdile elektrode s sponkami - krokodilčki.

Povezali smo pet 9 V baterij in iz kartona s tapetniškim nožem (lahko tudi s škarjami) izrezali tako imenovan glavnik, ki je imel toliko zobcev kot je bilo vrst barvil. Vsak zob je bil širok en centimeter, prav tako je bila med posameznimi zobmi razdalja en centimeter. Glavnik smo vstavili v posodo tako, da je bil na vsaki strani 0,5 cm oddaljen od roba posode.



Slika 11: Nastavitev bakrenih žic v posodi (lasten vir)



Slika 12: Namestitev glavnika iz kartona v posodi (lasten vir)

Zmešali smo 1 % raztopino sode bikarbone, kar je bil naš pufer⁵. Na tehtnici smo odtehtali 3,5 g sode bikarbone in jo zmešali s 350 ml destilirane vode. Polovico te mešanice (175 ml) smo zmešali z 1,75 g agarja in tako dobili 1 % raztopino agarja (preostanek mešanice - 175 ml smo shranili). Mešanico z agarjem smo segrevali v mikrovalovni pečici približno minuto in pol oz. dokler se agar ni raztopil (mešanica se je rahlo penila) vmes smo vsakih 15-20 s premešali.

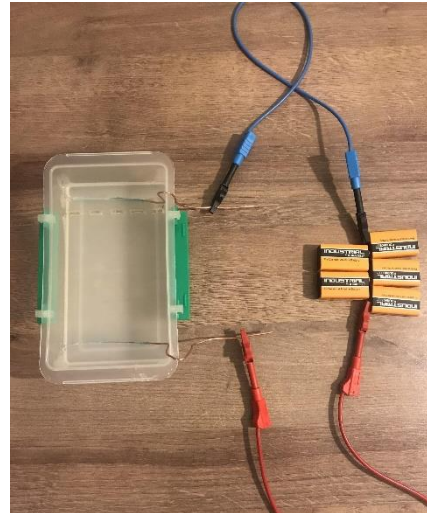
Nato smo počakali, da se je raztopljen agar ohladil na približno 60°C. Mešanico z agarjem smo prelili v posodo z vstavljenim glavnikom, ki je bil 1,5 cm odmaknjen od krajšega roba posode.

⁵ Snov, ki preprečuje, da bi se koncentracija vodikovih ionov v raztopini zaradi dodatka kisline ali baze bistveno spremenila (Fran.si, 2020).

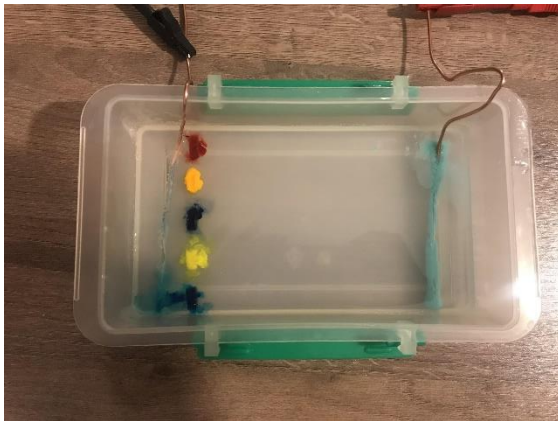
Po približno 30 min se je agar strdil do želatine. Takrat smo odstranili glavnik in vstavili žici/elektrodi tako, da sta bila kavlja na enaki strani posode. V posodo smo prelili preostanek raztopine sode bikarbone - pufer, toliko da je bila pokrita celotna površina agarja.

Zmešali smo 0,15 - 0,2 g barve v prahu z 1,5 - 2 ml vode. V luknje, ki jih je pustil glavnik, smo spustili kapljico barvila (od leve proti desni) vsako v svojo luknjo.

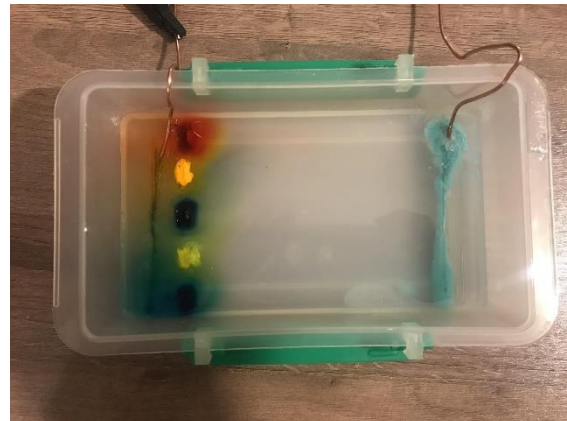
Ustvarili smo enosmeren električni tok tako, da smo elektrodo s sponkami povezali na negativen del sestavljenih baterij in žico, ki je bil bližje barvilom oz. luknjam, ki jih je pustil glavnik, pozitiven del sestavljenih baterij pa z žico, ki je bila bolj oddaljena od barvil.



Slika 13: Povezava baterij s posodo z agarjem (lasten vir)



Slika 14: Prikaz barvil po nanosu v luknjice (lasten vir)



Slika 15: Rezultat prvega poskusa - barvila so razlita po pufri (lasten vir)

Prvi poskus nam ni uspel. Barvila so se po pufri samo razlila in niso potovala skozi gel (kar je vidno na sliki št. 15).

Razmislili smo o možnih izboljšavah. Električni tok je tekkel ustrezno, saj so na pozitivni anodi vidni delci pufra, ki so se nabrali po elektrolizi. Tudi gel iz agarja je bil ustrezno konsistenten. Tako smo predvidevali, da je bila možna napaka ta, da smo barvila v prahu raztopili v vodi. Tako so bila prelahka in se niso potopila v luknjice, temveč so se samo razlila po površini agarja. Obtežimo pa jih lahko tako, da jih raztopimo v glicerolu, saj moramo vzorce nanašati v

gel, ko je ta že potopljen v pufer. Če je vzorec obtežen, lepo pade v žepek v gelu, v nasprotnem primeru se lahko vzorec razlije po pufru, kot v primeru mešanja barvil z vodo.

Prav tako smo sklepali, da bi bilo bolje, če je strjen gel iz agarja manjši kot komora, tako da pufer pokriva celotno površino in zunanji del gela in da so žice potopljene v pufer in ne nameščene v sam agar. Zato smo v naslednjem poskusu uporabili dve posodi različnih velikosti eno za pripravo gela in drugo za izvedbo elektroforeze.

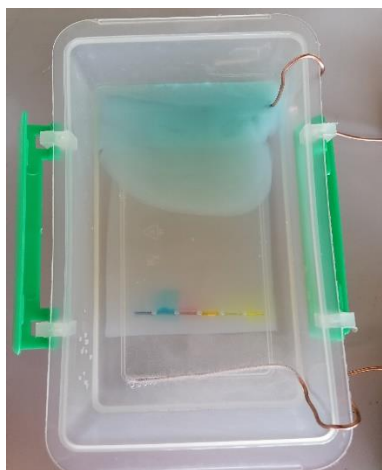
2.2.2 Izvedba postopka - drugi poskus

Za komoro smo vzeli posodo z merami $d = 18$ cm, $\check{s} = 8$ cm, $v = 4,5$ cm ter posodo za model za agar z merami $d = 15,5$ cm, $\check{s} = 11,5$ cm, $v = 3,5$ cm. Oblikovan glavnik smo vstavili v manjšo posodo - *nosilec za gel*, tako da je bil na vsaki strani 0,5 cm oddaljen od roba posode. Polovico pufru (175 ml 1 % raztopine sode bikarbone) smo namesto z agarjem zmešali z 1,75 g agaroze Sigma Aldrich (zamreženost agaroze je bolj enakomerna kot pri agarju). Mešanico z agarozo smo prelili v manjšo posodo z vstavljenim glavnikom. Namešali smo 0,15 - 0,2 g barve v prahu z 1,5 - 2 ml glicerola. Ko se je agarozna strdila, smo jo prestavili v večjo posodo - *komora za elektroforezo*, ter jo obrezali tako, da se je ob straneh prilegala in da je ob krajših koncih ostal prostor, kamor smo vstavili prej oblikovane žice. V komoro smo prelili preostanek raztopine sode bikarbone, toliko da je pokrita celotna površina agaroze, žici pa sta bili na vsakem koncu potopljeni v pufer. V luknjice smo s plastično kapalko spustili namešana barvila, ustvarili električni tok ter pustili stati 45 min.

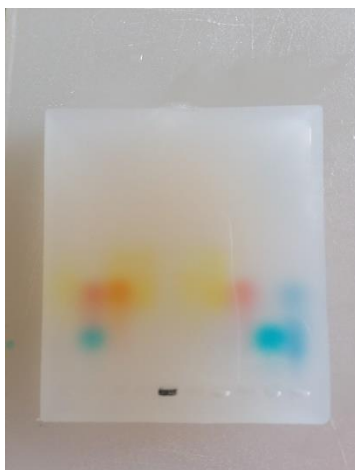
Gelska elektroforeza ponovno ni uspela, tako smo spet razmislili o možnih napakah. Tokrat smo sklepali, da je bila za neuspeh kriva napetost, ki je bila premajhna. Imeli smo zaporedno vezavo petih baterij po 5 V, torej je bila napetost visoka 45 V, pri profesionalni elektroforezi pa je priporočena napetost 100 V. To pomeni, da se molekule barvil niso mogle premikati skozi gel iz agaroze, saj je bil električni tok skozi gel premajhen. Hkrati pa smo sklepali, da smo v posamezne luknje spustili preveliko količino in previsoko koncentrirana raztopljena barvila. Ob visoki koncentraciji se ne uspejo popolnoma ločiti v gelu, potrebno je namreč le približno 0,003 g barvila na 1 ml 85 % glicerola. Tudi pri vstavljanju barvil v luknjice je bolje, da vnesemo manjšo količino, kar pa zaradi uporabe običajnih plastičnih Pasteurjevih pipet ni bilo mogoče (velikost kapljice je 45 μ l). Prav zato smo nabavili posebne kapilarne Pasteur pipete, ki omogočajo vnos manjše količine barvil v luknjice (volumen kapljice je 14 μ l).

2.2.3 Izvedba postopka - tretji poskus

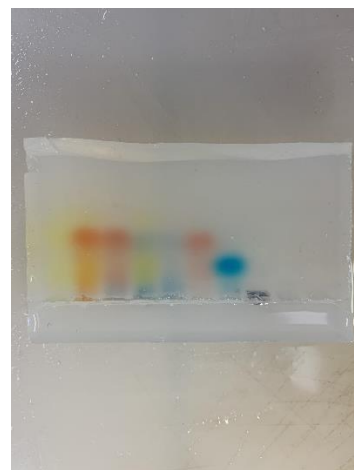
Namesto petih baterij smo tokrat uporabili deset 9 V baterij in tako ustvarili tok z napetostjo 90 V. Ker je to relativno visoka napetost, smo bili pri delu previdni in pazili, da se nismo dotaknili žic, ko je bil električni krog sklenjen. Ponovili smo enak postopek, kot pri drugem poskusu, le da smo pri vnašanju barvil v luknjice uporabili kapilarne pipete in v luknje, ki jih je pustil glavnik, spustili le eno kapljico barvila vsako v svojo luknjo. Konico pipete smo potopili direktno v luknjo in vanjo spustili barvilo. V tri luknje smo vnesli tudi mešanico dveh barvil, saj nas je zanimalo, ali se bodo barvila ločila.



Slika 16: Tretji poskus (lasten vir)



Slika 17: Barvne lise tretjega poskusa (lasten vir)



Slika 18: Barvne lise četrtega poskusa (lasten vir)

Tokrat je gelska elektroforeza uspela. Pravilno smo sklepali, da je bila v prejšnjih dveh poskusih težava v premajhni napetosti. Po 45 minutah so po agarju nastale barvne lise, ki so nakazovale, do kod so molekule posameznega barvila potovale. Prekinili smo električni tok in gel previdno vzeli iz komore ter ga položili na desko in z ravnilom izmerili dolžine barvnih lis (Tabela 1).

Ko smo dodelali postopek, smo gelsko elektroforezo izvedli še četrtič. Tokrat smo namesto agaroze uporabili jedilni agar. Prav tako smo naredili tri mešanice barvil, saj nas je zanimalo, ali se bodo zmešana barvila ločila ali ne. Dobili smo podobne rezultate kot v tretjem poskusu in tako potrdili, da postopek elektroforeze deluje in da sta za gel iz agarja primerna tako agaraza kot jedilni agar.

Na podlagi vseh zbranih podatkov in izkušenj smo oblikovali navodilo za vajo, ki bi bila primerna za izvedbo v srednji šoli. Napisali smo natančen seznam opreme in materiala ter natančno opisali postopek, ki bo omogočal učiteljem pripravo materiala in opreme, dijakom pa

izvedbo vaje. Dodali smo tudi slike za lažjo predstavo. Prav tako smo oblikovali delovni list z vprašanji in razpravo o dobljenih rezultatih.

3 REZULTATI

Izmerjene dolžine barvnih lis smo zbrali v tabeli in jih primerjali z velikostmi ter razvejenostjo molekul posameznih barvil. Glede na velikost in razvejenost molekul, smo najdaljšo razdaljo pričakovali pri barvilu E104 in najkrajšo pri E133. V 4. poskusu je barvilo E133 v primerjavi z E132 in E129 prepotovalo krajšo razdaljo, kar potrди pričakovanja, saj so molekule tega barvila večje in bolj razvejane. Najdaljšo razdaljo sta v tretjem poskusu prepotovali barvili E102 in E104. Rezultatov pa v nobenem izmed poskusov ni bilo pri barvilu E153 (rastlinsko oglje). Barvilo je ostalo v luknji in ni potovalo po gelu iz agaroze, saj molekula tega barvila ni nabita.

Tabela 1: Razdalja barvnih lis pri tretjem in četrtem poskusu

	Elektroforeza - 3. poskus	Elektroforeza - 4. poskus
barvilo	razdalja (cm)	razdalja (cm)
E133 (Briljantno modra)	3	0,7
E132 (Indigotin)	1,3	0,8
E129 (Allura rdeče)	2,9	1
E102 (Tartrazin)	3,8	/
E104 (Kinolinsko rumeno)	3,2	/
E102 + E132	/	modra: 0,8 in rumena: 1
E102 + E129	/	rumena: 0,4 in rdeča: 0,8
E129 + E132	/	vijolična: 0,9 - barvili se še nista ločili

K rezultatom smo vključili izdelana navodila za laboratorijsko delo s seznamom potrebnih pripomočkov, opisom metode, ter dodatnimi vprašanji za obdelavo in analizo dobljenih rezultatov ter za pridobivanje dodatnega znanja o gelski elektroforezi.

3.1. Vaja za dijake

Navodila za vajo vključujejo seznam opreme in materiala ter navodila, kako naj dijaki sestavijo komoro in izvedejo elektroforezo z različnimi barvili. Sledi obdelava rezultatov in vprašanja, ki se nanašajo na samo teorijo elektroforeze ter vključujejo razpravo o dobljenih rezultatih, do katerih so dijaki prišli. Navodila so oblikovana tako, da je poskus možno izvesti tudi v slabše opremljenem šolskem laboratoriju ali celo doma.

GELSKA ELEKTROFOREZA

Gelska elektroforeza je metoda, ki ločuje velike molekule na osnovi njihove velikosti in električnega naboja. Med elektroforezo se molekule premikajo skozi pore gela, ko nanje deluje električni tok. Aktivne elektrode na obeh koncih gela so pogonska sila, saj ena elektroda odbija molekule, druga elektroda pa jih hkrati privlači. Gelni material se upira toku molekul in jih ločuje po velikosti. Po obarvanju lahko ločene molekule v vsakem stolpcu vidimo kot niz trakov, ki se med seboj ločijo.

NAMEN VAJE

S pomočjo te vaje boste spoznali metodo gelske elektroforeze, ki jo boste uporabili za ločevanje umetnih barvil.

MATERIAL

- Dve plastični posodi - manjša (15,5 x 11,5 x 3,5 cm) in večja (18 x 8 x 4,5 cm)
- Bakrena žica (2 x 40 cm)
- Kleščice za rezanje žice
- Tapetniški nož
- Kuhinjski nož
- 10 baterij z napetostjo 9 voltov (POZOR visoka napetost, potrebna je pazljivost!)
- Električne ščipalke z žico ("krokodilčki") (2)
- Plastični pokrov (embalaža sladoleda)
- Mikrovalovna pečica
- Tehnica
- Merilni valj
- Plastična posoda

- Posoda, ki je primerna za mikrovalovno pečico
- Plastična kapalka
- Soda bikarbona
- jedilni agar ali agaroz
- 85% glicerol
- Barvila:
 - E104 - kinolinsko rumeno
 - E129 - allura rdeče
 - E132 - indigotin
 - E133 - briljantno modra
 - E153 - rastlinsko oglje

Zaščita

- Zaščitni plašč
- Zaščitne rokavice
- Zaščitna očala

POSTOPEK

1. Žico razreži na dva enaka dela in ju oblikuj v dva kaveljčka. Dolga naj bosta toliko, da gledata iz posode tako, da se lahko nanju pritrdijo električne ščipalke - krokodilčki.
2. Zaporedno poveži deset 9 V baterij, kot je prikazano na sliki št. 2.



Slika 1: Postavitev žic v posodi



Slika 2: Vezava baterij

3. Iz plastičnega pokrova s tapetniškim nožem (lahko tudi s škarjami) izreži tako imenovan glavnik, ki naj ima toliko zobcev kot je vrst barvil. Vsak zob naj bo širok en centimeter,

prav tako naj bo med posameznimi zobmi razdalja en centimeter. Glavnik vstavi v drugo (manjšo) posodo - nosilec za gel, tako da je na vsaki strani 0,5 cm oddaljen od roba posode.



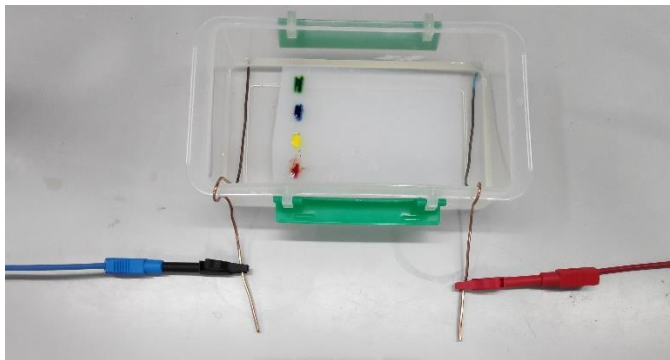
Slika 3: Glavnik s petimi zobci

4. Zmešaj 1 % raztopino sode bikarbone, ki jo boš uporabil/a kot pufer. Na tehtnici odtehtaj 3,5 g sode bikarbone in jo zmešaj s 350 ml destilirane vode.
5. Polovico te mešanice (175 ml) zmešaj z 1,75 g agarja ali agaroze, da dobiš 1 % raztopino. Preostanek mešanice - 150 ml shrani.
6. Mešanico z agarjem segrevaj v mikrovalovni pečici približno minuto in pol, dokler se agar ne raztopi (mešanica se rahlo peni). Med segrevanjem vsakih 15-20 s premešaj.
7. Počakaj, da se raztopljena agarozna ohladi na približno 50°C. Ohlajeno mešanico z agarjem prelij v manjšo plastično posodo z glavnikom, ki je 1,5 cm odmaknjen od krajšega roba posode (slika 4).



Slika 4: Namestitev glavnika v posodo z gelom iz agaroze

8. Po približno 30 minutah se agar strdi. Takrat odstrani glavnik, strjen agar pazljivo premesti v večjo posodo (to je komora za elektroforezo). Po potrebi obreži, tako da se ob straneh prilega, ob koncih pa ostane prostor, kamor vstavimo prej oblikovane žice, tako da sta kavlja na enaki strani posode.
9. V posodo prelij preostanek raztopine sode bikarbone - pufer, toliko da je pokrita celotna površina agarja.
10. Zmešaj posamezna barvila in mešanice barv z glicerolom, kjer za noževno konico (0,003 g) barvila v prahu primešaš 1 ml 85 % glicerola.
11. V luknje, ki jih je pustil glavnik, spusti čim manjšo kapljico barvila (do 10 μ l), tako da je luknja napolnjena največ do $\frac{3}{4}$. Kapalko s kapilarno konico potopi naravnost v luknjo in vanjo spusti barvilo.
12. Ustvari enosmeren električni tok. Elektrodo s sponkami poveži na negativni del sestavljenih baterij in žico, ki je bližje barvam oz. luknjam, ki jih je pustil glavnik. Pozitiven del sestavljenih baterij pa poveži z žico, ki je bolj oddaljena od barv.
13. Pozor! Ob priklopu se ustvari visoka napetost, zato je potrebno biti pazljiv!



Slika 5: Komora za elektroforezo z barvili priključena na enosmeren električni tok

14. Po 45 minutah z izklopom vira napetosti postopek zaključimo.

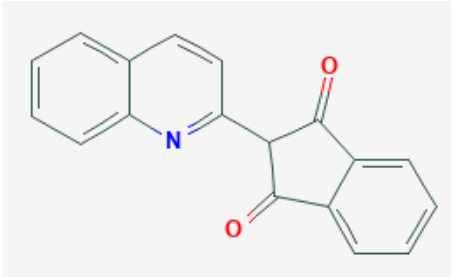
REZULTATI

1. Skiciraj gel z barvnimi lisami in izmeri posamezne razdalje, ki so jih barvila prepotovala. Na skici označi katera lisa predstavlja katero barvo. Nariši graf, ki bo prikazoval razdalje posameznih barvil.

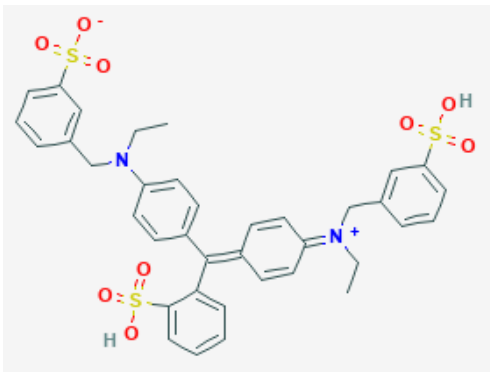
VPRAŠANJA

1. Za katere molekule pričakujemo, da bodo na agarju prepotovala najdaljšo in katere najkrajšo pot?
2. Katero izmed barvil je v vašem poskusu pripotovala po agarju najdlje in kaj lahko na podlagi tega sklepaš o njegovi kemijski zgradbi?
3. Ali se vaši rezultati skladajo s pričakovanimi, če upoštevamo kemijsko zgradbo uporabljenih barvil?
4. Eno izmed barvil je ostalo na mestu in po agarju ni potovalo. Navedi vsaj dva možna vzroka, zakaj je barvilo ostalo v luknjici, čeprav so vse ostale barve potovale od negativnega k pozitivnemu delu.
5. Pojasni zakaj smo na žico, ki je bližje luknjam z barvili, pritrdili negativni del baterij in ne pozitivnega dela.
6. Dijaki so v izvedbi vaje namesto 1 % gela iz agaroze uporabili 2 % gel iz agaroze. Pojasni kako se je spremenila hitrost potovanja molekul barvil in kako razdalja med luknjo in končno barvno liso.

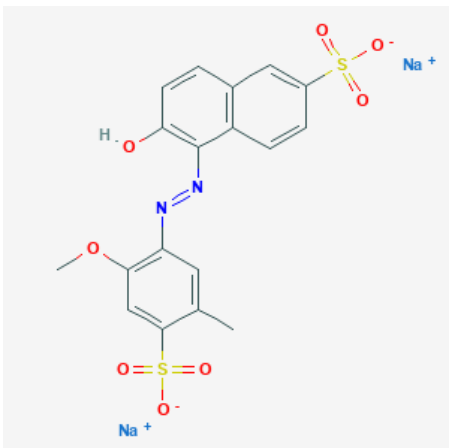
7. Spodnje molekule posameznih barvil razporedi glede na prepotovano dolžino po agaroznem gelu.



Slika 6: Molekulska formula barvila E104 - Kinolinsko rumeno



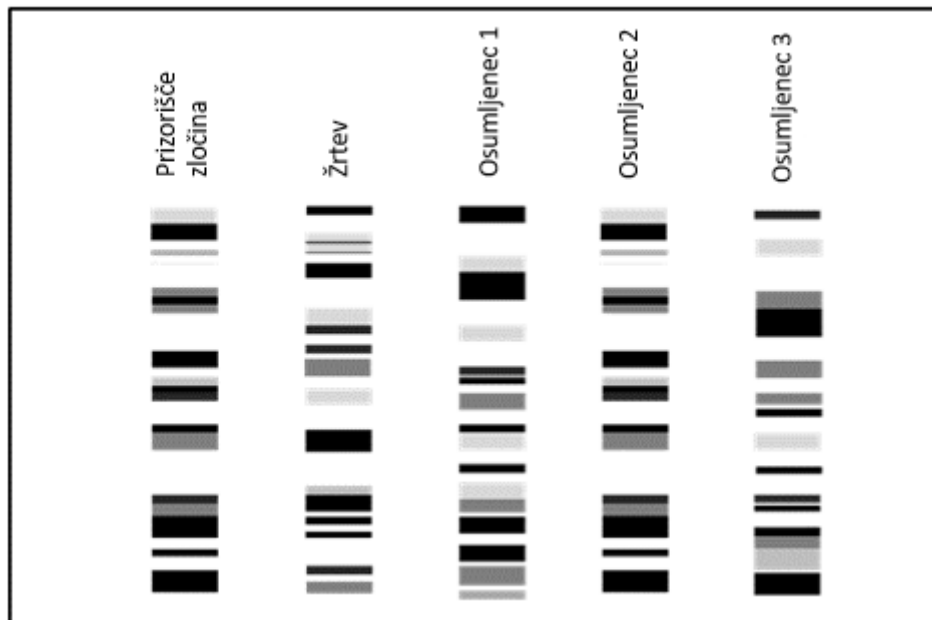
Slika 7: Molekulska formula barvila E133 - Briljantno modra



Slika 8: Molekulska formula barvila E129 - Allura rdeče

_____ < _____ < _____

8. V trgovini si kupil osvežilno pijačo živahno rdeče barve. Kako bi na podlagi pridobljenega znanja ugotovil, ali je v njej prisotno barvilo allura rdeče?
9. Gelska elektroforeza se lahko uporablja tudi za ločevanje fragmentov DNA. Navedi dva primera, kaj vse lahko v znanstvenih laboratorijih ugotavljajo s pomočjo te metode.
10. Zakaj po končani elektroforezi z DNA fragmenti ne moremo takoj odčitati rezultatov?
11. Katere so omejitve za uporabo te metode pri vajah iz biologije v srednji šoli?
12. Spodnja slika prikazuje rezultate gelske elektroforeze DNA petih različnih oseb. Prva DNA je bila najdena na kraju zločina, druga pripada žrtvi zločina, ostale tri pa osumljencem zločina. Ugotovi, kateri osumljenec (1, 2 ali 3) je storilec zločina in pojasni na podlagi česa si prišel/la do te ugotovitve.



Slika 9: Rezultati gelske elektroforeze DNA

4 RAZPRAVA

Navodila, ki smo jih našli na spletu (www.sciencebuddies.org), niso vodila do uspešne izvedbe, saj v prvih dveh poskusih postopek ni deloval. Vzrok je bil v gelu, ki bi mogel biti manjši od komore, tako so elektrode bile potopljene v gel iz agarja in ne v pufer, tudi napetost 45 V je bila prenizka. Z načrtovanjem izboljšav in preizkušanjem smo uspeli razviti delujoč sistem, ki je dal zadovoljive rezultate. Barvila so potovala po gelu iz agaroze, prav tako so se mešanice barvil ločile (modra in rumena, rumena in rdeča). Rezultat gelske elektroforeze barvil je bil, da so se barvila ločila po gelu iz agaroze zaradi negativnega naboja ob ustvarjenem električnem toku pod napetostjo 90 V. Potovanje molekul je odvisno predvsem od velikosti in razvejanosti, manjše in manj razvejane molekule barvil potujejo dlje kot molekule barvil, ki so daljše in bolj razvejane. Iz rezultatov sta izstopali barvili E133 in E102. V 3. poskusu sta potovali dlje, kot barvila z manjšimi molekulami, kar se ne sklada s teorijo glede hitrosti potovanja molekul. S ponovitvijo je v 4. poskusu barvilo E133 v primerjavi z E132 in E129 prepotovalo krajšo razdaljo, kar potrди pričakovanja, saj so molekule tega barvila večje in bolj razvejane, zato skozi gel ne potujejo tako hitro. Najdaljšo razdaljo smo pričakovali pri barvilu E104, saj so molekule manjše in najmanj razvejane, ampak je v 3. poskusu barvilo E102 potovalo dlje. Zaradi nezanesljivih rezultatov, ki niso bili v skladu s pričakovanji, odsvetujemo uporabo barvila E102 (tartrazin). Rezultatov ni bilo pri barvilu E153 (rastlinsko oglje), saj molekula ni nabita in zato ni potovala skozi gel. Z večimi ponovitvami smo prišli do ugotovitve, da sta za gel najbolj primerna agarozna in jedilni agar, tehnični agar pa ni primeren. Ko se tehnični agar strdi, je lomljiv, pod napetostjo se segreje in se ob vzetju iz komore lahko prelomi.

Za pridobitev zanesljivejših rezultatov, bi morali vajo še večkrat ponoviti, kar pa še žal ni bilo možno zaradi šolanja na daljavo. S ponovitvami bi lahko tudi natančneje preverili odstopanje potovanja molekul tartrazina (E102) od pričakovanih rezultatov. Možno je, da je v 3. poskusu prišlo do slučajnega odstopanja tega barvila, ki se pri ponovitvi morda ne bi ponovilo.

Z dijaškega stališča smo razvili cenovno ugoden didaktični pripomoček, ki je namenjen prikazu tehnike gelske elektroforeze s pomočjo varnih in cenovno dostopnih pripomočkov. V srednjih šolah se namreč v sklopu molekulske genetike izvajata le ena do dve vaji, kar pomeni, da bi z uvedbo predstavljene vaje lahko pouk popestrili in povečali zanimanje dijakov za pridobivanje novih znanj na tem področju. Profesorji lahko vajo popestrijo tudi z dodatnim delom, kjer

namesto barvil dijakom dajo različna živila, ki vsebujejo umetna barvila. Tako lahko dijaki poskusijo določiti vrste umetnih barvil, ki jih vsebuje določeno živilo.

Del eksperimentalnega dela je zaradi zaprtja šol potekal tudi doma. S pomočjo v trgovini kupljenega materiala smo uspeli set za elektroforezo sestaviti tudi doma. Namen je bil vajo izvesti tudi v razredu in dijakom/sošolcem predstaviti naš inovacijski predlog in ga tako preizkusiti v praksi. Zaradi izjemnih razmer v času epidemije pouk v šoli ni bil mogoč, zato ta del ni bil izveden.

Na šoli imamo set za horizontalno elektroforezo, ki pa je pri pouku zaradi nevarnosti etidijevega bromida in pomanjkanja prostora pri pouku ne uporabljamo. Prav tako šola nima transiluminatorja. Razvit način izvajanja metode gelske elektroforeze je enostaven in cenovno ugoden. Pripravili smo izračun stroškov za izvedbo metode elektroforeze s profesionalno opremo in izvedbo cenovno ugodne elektroforeze. Izračun je narejen za komplet opreme in materiala za demonstracijo eksperimenta (1 komplet) in za izvedbo v razredu (6 kompletov).

4.1 Izračun stroškov profesionalne elektroforeze

Tabela 2: Seznam in cena opreme za profesionalno elektroforezo

MATERIAL	CENA
Napajalnik za elektroforezo: Owl™ 300 napajalnik (Mikro Polo)	536,80 €
Set za elektroforezo: Owl™ EasyCast™ B1A, horizontalna (Mikro Polo)	329,40 €
Avtomatska pipeta (Mikro Polo)	270,84 €
TAE pufer, 10x koncentrat (Sigma)	69,19 €
Skupni znesek za en komplet	1.206,23 €
Skupni znesek za en razred	3.931,71 €

Naveden seznam omogoča demonstracijsko izvedbo elektroforeze, z enim setom lahko profesor izvede elektroforezo pred dijaki. En napajalnik omogoča priklop treh elektroforeznih setov. Za izvedbo vaje v celotnem razredu, razdeljenih v 6 skupin (po 3-4 dijaki v skupini) sta potrebna dva napajalnika in 6 elektroforeznih setov. Dve skupini bi si delili eno avtomatsko pipeto, kar pomeni, da nabava treh znese 812,52 €. Vse skupaj cenovno znaša 3.931,71 €.

4.2 Izračun stroškov doma narejene elektroforeze

Tabela 3: Seznam in cena opreme za doma narejeno elektroforezo

MATERIAL	CENA
plastični posodi različnih velikosti: večja in manjša (mimovrste)	4,19 € in 3,99 €
Alkalne blok baterije 9 V, 10 kosov (Megashop)	17,95 €
Plastična pipeta, 1 ml, 500 kosov (Mikro Polo)	32,22 €
Kabli s krokodilčki: komplet 10 kablov (Conrad)	7,34 €
Bakrena žica, 1 mm, 4 m (Rayher)	1,99 €
Klešče (Merkur)	5,99 €
Skupni znesek za en komplet	73,67 €
Skupni znesek za en razred	211,66 €

Za izvedbo vaje v razredu je potrebnih 6 kompletov posodic, 6 kompletov alkalnih blok baterij po 10 kosov, 2 kompleta kablov s krokodilčki po 10 kosov, 1 bakreno žico (4 m) in ene klešče. Izračun stroškov kaže, da je izvedba doma narejene elektroforeze cenovno veliko ugodnejša. Nabava materiala ni težavna, saj se del materiala lahko kupi v trgovini, sama izvedba elektroforeze pa ni zahtevna in služi svojemu namenu, saj so rezultati zelo podobni tistim, ki

jih dobimo pri profesionalni elektroforezi. Tako je taka izvedba elektroforeze priporočljiva, profesorjem olajša delo hkrati pa pritegne pozornost dijakov k laboratorijskemu delu.

4.3 Stroški za ostali material

Tabela 4: Cena materiala za elektroforezo

MATERIAL	CENA
Agaroz, 250 g (Sigma)	150,00 €
Agar agar, 50 g (PEKIS)	5,20 €
E102 - Sunset Yellow (PEKIS)	3,50 €
E104 - Lemon Tart (PEKIS)	3,50 €
E129 - Red (PEKIS)	3,00 €
E132 - Royal Blue (PEKIS)	3,00 €
E133 - Blue (PEKIS)	3,50 €
E153 - Black (PEKIS)	3,00 €
Skupni znesek v primeru uporabe agaroze	169,50 €
Skupni znesek v primeru uporabe agarja	24,70 €

Predstavljen didaktični pripomoček je možno uporabiti tudi za ločevanje fragmentov DNA, v primeru uporabe varnega barvila za obarvanje fragmentov DNA. Barvila, ki so varna za uporabo so:

- SYBR safe: 400 µl - 66.04 € (Invitrogen),
- SYBR green: 500 µl - 288.84 € (Invitrogen),
- DAPI: 10 mg - 66.65 € (Biotium),
- Kristalno vijolična: 50 mg - 79.82 € (Selleckchem).

Fragmente DNA lahko z prej navedenimi barvili obarvamo in jih opazujemo s pomočjo UV svetlobe ali modre svetlobe z uporabo transiluminatorja. Ker pa imajo transiluminator in barvila za obarvanje DNA fragmentov visoko ceno (cene za transiluminator se gibljejo okrog 1700 € in več), je uporaba umetnih barvil cenovno ugodnejša.

4.4 Možni viri napak

Med izdelavo inovacijskega predloga smo naleteli na več napak, ki so bile vzrok za neuspešnost ali slabšo uspešnost poskusov. Pri izvajanju gelske elektroforeze moramo zato biti pozorni na naslednje:

1. Če imamo barve v prahu jih raztopimo v glicerolu, saj jih tako obtežimo. Vzorce moramo namreč nanašati v gel, ko je ta že potopljen v pufer. Če jih raztopimo v vodi, se barvila ne bodo usedla v luknjice in se bodo razlila po pufru.
2. Gel iz agaroze mora biti manjši kot komora, tako da pufer pokriva celotno površino, žice/elektrode pa vstavimo na straneh tako, da so potopljene v pufer.
3. V gelu iz agaroze se barve bolj enakomerno razločijo, kot v gelu iz agarja, ker je zamreženost agaroze bolj enakomerna. V primeru uporabe agarja pa je jedilni agar iz PEKIS-a primernejši od tehničnega agarja, saj se slednji pod napetostjo preveč segreje in postane lomljiv.
4. Preveriti moramo naboj barv, s katerimi izvajamo poskus, saj če so te nabite negativno jih nanašamo na negativno stran komore, če pa so nabite pozitivno na pozitivno stran.
5. Baterije morajo biti polne. Za doseg vsaj 90 V je potrebnih deset 9 V baterij.
6. Bakrena žica mora biti nova zaradi pojava elektrolize⁶ med izvajanjem elektroforeze.

⁶ Elektroliza je proces, ki poteka z enosmerno napetostjo, ki jo priključimo na elektrodi - katoda in anoda (Eucbeniki.sio.si, 2016).

4. 5. Umestitev vaje v učni načrt

Prikazana metoda lahko pomaga pri uresničevanju ciljev Učnega načrta za biologijo (<http://eportal.mss.edus.si>). Dijakom olajša osvajanje vsebinskega znanja in omogoča poglobljeno razumevanje vsebinskih sklopov Zgradba in delovanje celice (sklop C), Geni in dedovanje (sklop D) ter Raziskovanje in poskusi (sklop B). Eden izmed glavnih ciljev pouka biologije je vzbujanje zanimanja za učenje biologije in naravoslovja ter razvijanje sposobnosti za povezovanje in uporabo znanja iz biologije in drugih naravoslovnih področij pri reševanju problemov. Inovacijski predlog posega tudi na področje kemije (kemijska zgradba barvil) ter tako dijakom omogoča povezovanje znanj različnih naravoslovnih predmetov. Učni načrt v sklopu procesnih ciljev pod točko 3.4 navaja, da mora pouk biologije pri dijakih razvijati sposobnost kompleksnega razmišljanja in povezovanja znanja (P-1) ter zmožnost načrtovanja in izvajanja enostavnih bioloških poskusov in raziskav ter interpretacije rezultatov (P-2). Pri izvedbi elektroforeze dijaki razvijajo svoje ročne spretnosti in spretnosti pri izvajanju eksperimentov, z dodatnimi vprašanji pa vadijo interpretacijo rezultatov in le-te povezujejo s teoretičnim znanjem. Ker so navodila za vajo oblikovana tako, da jo lahko dijaki izvajajo v skupini, inovacijski predlog ustreza tudi procesnemu cilju, kjer dijaki razvijajo sposobnost za samostojno in skupinsko delo ter ustrezno komunikacijo v različnih situacijah (P-4).

Ker se izvedbe učnega načrta med srednjimi šolami razlikujejo, kot primer vpeljave vaje v učni načrt predlagamo možnosti izvedbe na II. gimnaziji Maribor, v okviru programa splošne gimnazije.

Vajo je možno izvesti enkrat v štirih letih šolanja:

1. Na koncu 1. letnika ali na začetku 2. letnika pri rednem pouku biologije, v sklopu molekulske genetike.
2. V 3. letniku pri izbirni biologiji v sklopu biotehnologije.
3. V 4. letniku pri pridobivanju poglobljenega znanja v sklopu molekulske genetike.

Glavni cilj pouka biologije je celostno razumevanje biologije, torej razumevanje vsebinskih konceptov in povezav med njimi. Pri pouku dijakinje in dijaki poglobijo razumevanje bioloških konceptov skozi čim več laboratorijskega in terenskega raziskovanja ter drugih aktivnosti (Vihar, 2008). Naš inovacijski predlog je dodatna laboratorijska vaja, ki jo lahko profesorji vpeljejo v pouk in jo dodajo k ostalim načrtovanim vajam. Velika večina dijakov si zapomni

več stvari, ki so izvedene praktično, torej pri eksperimentalnih vajah, pomnjenje abstraktnih vsebin pa se izkaže za težavno. Tako lahko izvedba vaje dijakom olajša razumevanje ter pomnjenje vsebin v sklopu molekulske genetike.

5 ZAKLJUČEK

Cilj inovacijskega predloga je bil razviti poenostavljen postopek gelske elektroforeze za ločevanje umetnih barvil, s katerim bi dijakom lažje prikazali tehniko gelske elektroforeze. Uspelo nam je sestaviti didaktični pripomoček in izvesti postopek gelske elektroforeze, ki je cenovno zelo ugoden ter primeren tudi za izvedbo doma oziroma v povprečno opremljenem šolskem laboratoriju. Postopek smo morali večkrat ponoviti, saj je sprva imel nekaj težav, na primer premajhna napetost in raztapljanje barvil z vodo. Po večkratnih poskusih in odpravi teh težav smo uspešno izvedli elektroforezo z barvili E102, E104, E129, E132, E133 ter njihovimi mešanici.

Oblikovali smo navodila za vajo za dijake s seznamom materiala ter navodili za izvedbo elektroforeze. Oblikovali smo tudi vprašanja, s katerimi lahko dijaki utrdijo in nadgradijo svoje znanje.

Na koncu smo naredili izračun vseh stroškov, potrebnih za izvedbo poenostavljene elektroforeze ter jih primerjali s stroški, ki so potrebni za izvedbo profesionalne elektroforeze. Ugotovili smo, da je izdelava elektroforeze za ločevanje umetnih barvil cenovno veliko bolj ugodna, saj so cene za nabavo seta profesionalne elektroforeze zelo visoke. Oblikovali smo tudi predlog, kam v učni načrt bi pri pouku biologije v splošni gimnaziji vključili sestavljeno vajo.

Vajo nameravamo preizkusiti in izvesti v razredu, ko bo možno. Predstavljeni postopek gelske elektroforeze je zasnovan tako, da ga lahko dijaki ob nabavi navedenega materiala, ki je dostopen v običajnih trgovinah, izvedejo tudi doma, kar je še posebej primerno v času šolanja od doma.

Inovacijski predlog predstavlja izvedbo metode na področju molekulske genetike, ki je med laično populacijo slabo poznana. Izvedba vaje ima več možnih koristi. Dijaki lahko pridobijo poglobljeno znanje o gelski elektroforezi DNA, lahko pa se osredotočijo na raziskovanje samih umetnih barvil in tako izboljšajo poznavanje snovi. Učenje s pomočjo didaktičnega pripomočka je veliko lažje in bolj zanimivo za dijake, tako lahko snov tudi bolj obvladajo in razumejo.

Upamo, da bomo s predstavljenim didaktičnim pripomočkom in natančnimi navodili za delo pomagali učiteljem in na ta način motivirali dijake ter jim olajšali razumevanje zahtevnih tehnik molekulske genetike.

6 DRUŽBENA ODGOVORNOST

Ob izdelavi inovacijskega predloga smo bili pozorni tudi na družbeno odgovornost, saj smo se izdelave inovacijskega predloga lotili resno, odgovorno in v skladu z načeli družbene odgovornosti.

Izdelek, ki smo ga izdelali v sklopu inovacijskega predloga je cenovno ugoden in dostopen vsem srednjim šolam, ki lahko tako prihranijo pri nabavi opreme, ki je potrebna za izvedbo gelske elektroforeze. Tudi delo z umetnimi barvili je veliko varnejše in s tem tudi lažje od dela z DNA, kjer bi morali v sam poskus vključiti še uporabo nevarnega barvila etidijevega bromida in transiluminator. S sestavo delovnega lista, ki ga bodo lahko profesorji uporabili pri izvedbi vaje v razredu, bomo dijakom omogočili lažje razumevanje zanimivega postopka gelske elektroforeze.

Pri izdelavi inovacijskega predloga smo imeli v mislih tudi trenutne okoliščine šolanja, kjer smo dijaki primorani obiskovati pouk na daljavo, ne pa v šoli. Velik problem pri tovrstni obliki šolanja predstavlja tudi izvedba laboratorijskih vaj, ki je precej okrnjena. Prav zato smo se odločili, da izdelamo vajo za dijake, ki jo bo možno izvesti tudi doma. Vajo lahko dijaki izvedejo s pomočjo pripomočkov, ki jih je možno kupiti v navadni trgovini ali pa zanje poskrbi šola in ne predstavljajo višjega finančnega stroška. Pozitivna lastnost izvajanja vaje je tudi zmanjšanje monotoni sedenja za računalnikom med poukom na daljavo. Le tako lahko izboljšamo posameznikovo zanimanje za pouk biologije v teh težkih časih, ko nam izrazito upada motivacija za pridobivanje novega znanja.

7 VIRI IN LITERATURA

Addgene, (2018). *Agarose Gel Electrophoresis*. Dostopno na URL naslovu:

<https://www.addgene.org/protocols/gel-electrophoresis/> (7.2.2021)

Brajkovič, B. Genetika. Ljubljana: DZS, 2006

Christopher P. A., (2020). *Electrophoresis*. Dostopno na URL naslovu:

<https://www.genome.gov/genetics-glossary/Electrophoresis> (27.10.2020)

Eucbeniki.sio.si, (2016). Kaj je elektroliza. Dostopno na URL naslovu:

<https://eucbeniki.sio.si/kemija2/619/index1.html> (27. 3. 2021)

Eucbeniki.sio.si, (2016). Kislost in bazičnost aminokislin. Dostopno na URL naslovu:

<https://eucbeniki.sio.si/kemija3/1265/index3.html> (27. 3. 2021)

Fran.si, (2020). *Pufer*. Dostopno na URL naslovu:

<https://fran.si/iskanje?View=1&Query=pufer> (27. 3. 2021)

IACM, (2021). *Vegetable carbon*. Dostopno na URL naslovu: <https://iacmcolor.org/color-profile/vegetable-carbon/> (11. 2. 2021)

Inštitut za nutricionistiko, (2016). *Aditivi v živilih*. Dostopno na URL naslovu:

<https://prehrana.si/sestavine-zivil/aditivi-v-zivilih> (10. 2. 2021)

Inštitut za nutricionistiko, (2016). *Barvila v živilih*. Dostopno na URL naslovu:

<https://prehrana.si/sestavine-zivil/aditivi-v-zivilih/barvila> (10. 2. 2021)

Klenar T. (2015). *Možnosti uporabe elektroforeze DNA pri pokuku v osnovni šoli*. Dostopno na URL naslovu: [Diplomsko delo Klenar Tadeja.pdf \(uni-lj.si\)](#) (27.10.2020)

Kobun R., (2016). *Extraction, Analytical and Advanced Methods for Detection of Allura Red AC (E129) in Food and Beverages Products*. Dostopno na URL naslovu:

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.00798/full> (11. 2. 2021)

Labcompare, (2021). Transilluminator. Dostopno na URL naslovu:

<https://www.labcompare.com/Pharmaceutical-Lab-Equipment/24512-UV-Transilluminator/>
(27. 3. 2021)

More D., 2020. *The potential risks of tartrazine*. Dostopno na URL naslovu: <https://www.verywellhealth.com/tartrazine-free-diet-83227> (11. 2. 2021)

NIJZ, (2013). *Kaj so barve/barvila za živila?*. Dostopno na URL naslovu: <https://www.nijz.si/sl/kaj-so-barvebarvila-za-zivila-0> (10. 2. 2021)

Rademaker M. (2003). *Food additives and E numbers*. Dostopno na URL naslovu: <https://dermnetnz.org/topics/food-additives-and-e-numbers/> (11. 2. 2021)

Rozman D. (2013). *Eksperimentalne metode za delo z nukleinskimi kislinami in proteini*. Dostopno na URL naslovu: <http://ibk.mf.unilj.si/teaching/biokemija1/predavanja/predavanje36R13.pdf> (14.2.2021)

Science Buddies Staff, (2020). *Forensic Science: Building Your Own Tool for Identifying DNA*. Dostopno na URL naslovu: https://www.sciencebuddies.org/science-fair-projects/project-ideas/BioChem_p028/biotechnology-techniques/forensic-science-building-your-own-tool-for-identifying-dna (10.10.2020)

Surat P., (2018). *Electrophoresis as a Tool in Forensics*. Dostopno na URL naslovu: <https://www.news-medical.net/life-sciences/Electrophoresis-as-a-Tool-in-Forensics.aspx> (7. 2. 2021)

Vihar, B., (2008). *UČNI načrt. Biologija: splošna gimnazija*. Dostopno na URL naslovu: http://eportal.mss.edus.si/msswww/programi2018/programi/media/pdf/ucni_nacrti/UN_BIOL_OGIJA_gimn.pdf (12. 5. 2021)