

Poškození DNA vlivem ionizujícího záření

Ondřej Malý

Gymnázium Jeseník, a.petit@centrum.cz

Karla Procházková

Gymnázium Písek, karlaprochazkova@seznam.cz

Pavla Martincová

Gymnázium Broumov, pavla.martincova@centrum.cz

Abstrakt:

Cílem naší práce bylo určit výtěžky jednoduchých a dvojných zlomů plasmidové DNA v závislosti na dávce. K tomu jsme použili metodu horizontální agarózové elektroforézy. Vzorky byly ozářeny ^{60}Co v intervalu 0 až 10 Gy. Vyhodnocení jsme provedli pomocí softwaru Luthien. Pro jednoduché zlomy jsme ověřili lineární závislost jejich počtu na dávce, u dvojných zlomů nebyl v daném rozsahu dávek jejich počet nijak významný.

1 Úvod

Buněčné jádro obsahující DNA je nejvýznamnějším terčem účinků ionizujícího záření. Pro ionizující záření je typická produkce zlomů DNA, a to jak jednoduchých (SSB – *single strand breaks*), tak dvojných (DSB – *double strand breaks*). Výzkumy prováděné na plasmidové DNA v roztoku umožňují studovat přímý účinek záření, neboť narozdíl od buňky se zde neuplatňují reparační mechanismy. Používá se tzv. „smotaná“ (*supercoiled*) DNA. Když je indukován jednoduchý zlom, plasmid změní svůj tvar na kruhový. Pokud je způsoben dvojný zlom (definován jako zlomy řetězců, jejichž vzdálenost je menší než 10-15 fázových párů), změní plasmid svou formu na lineární. Tyto tři formy lze rozlišit metodou horizontální agarózové elektroforézy, protože v elektrickém poli migrují různou rychlostí ⁽¹⁾.

2 Materiály a metody

Experimenty jsme prováděli na plasmidech *pCDNA3*, jednom z nejčastěji používaných plasmidů v molekulární biologii. Plasmidy, kruhové molekuly DNA nacházející se mimo buněčné jádro, jsou izolovány z bakterií. Přítomnost DNA v poskytnutém vzorku jsme ověřili pomocí spektrofotometru *Genesys 6*, sloužícím pro kvantitativní analýzu v rozsahu vlnových délek 190-1100 nm.

Zkoumaný vzorek obsahoval vždy 100 ng zmíněné plasmidové DNA v 10 mM pufru; celkový objem vzorku činil 10 μl . Vzorky byly následně ozářeny v polypropylenových tubičkách (Eppendorf; 1,5 ml) ve vzduchu kobaltovým zdrojem ^{60}Co v Ústavu jaderné fyziky (Oddělení dozimetrie záření) v intervalu 0 až 10 Gy. Následně jsme připravili 0,8% agarózový gel s přidaným fluorescenčním barvivem Sybr Green I, které se specificky váže na DNA. Jednotlivé formy DNA jsme odseparovali metodou agarózové elektroforézy: vzorky

jsme pipetou deponovali do gelu a nechali je migrovat po dobu 3 hodin při napětí 100 V. Výsledkem byl vznik proužků, viditelných pod UV lampou, představujících migrace jednotlivé formy DNA, které domigrovali do různé vzdálenosti. Gel byl vyfotografován digitálním fotoaparátem za použití speciálního želatinového filtru propouštějící jen určité vlnové délky tak, aby výsledný obraz byl co nejkvalitnější.

Analýzu vzorku jsme provedli pomocí softwaru Luthien, jenž byl vyvinut v již zmiňovaném Ústavu jaderné fyziky. Takto jsme zjistili procentuální zastoupení lineární, kruhové a smotané DNA. Počet jednoduchých a dvojných zlomů na jeden plasmid jsme vypočetli pomocí vztahů ⁽²⁾:

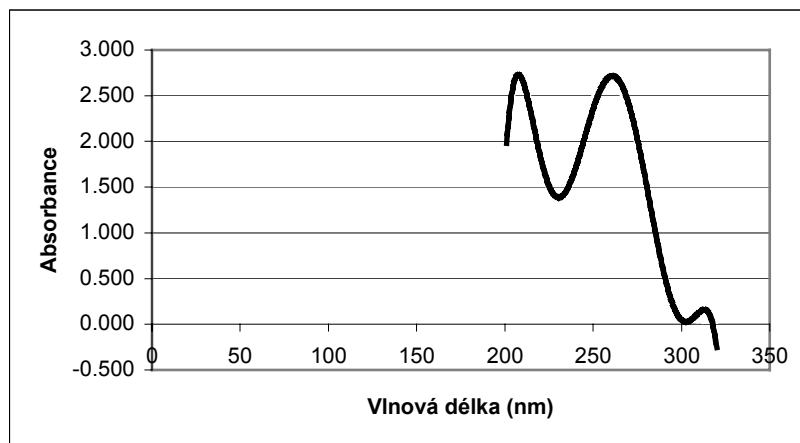
$$\bar{x} = \ln[(1 - L')/S'] \text{ a}$$

$$\bar{y} = L'/(1 - S'),$$

kde \bar{x} je střední hodnota počtu jednoduchým zlomů, \bar{y} je střední hodnota počtu zlomů dvojných, L' je zastoupení lineární formy DNA a S' je zastoupení smotané formy DNA. Každý z nás si připravil, deponoval a vyhodnotil sadu 6 vzorků, výsledky jsou jejich průměrem.

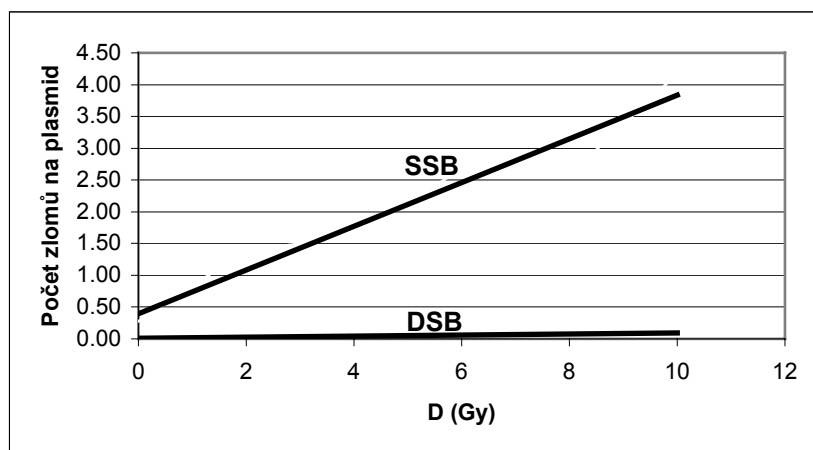
3 Výsledky a diskuse

Z grafu získaného spektrometrem (Graf 1) vyplývá, že se DNA ve vzorku opravdu vyskytuje. Množství DNA ve vzorku se určuje z absorbance (A) při vlnové délce 260 nm; je známo, že $A=1$ odpovídá množství DNA $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. ⁽³⁾ V našem vzorku bylo tedy $137,5 \text{ ng}$ DNA.



Graf 1: Závislost absorbance na vlnové délce.

Ověřili jsme, že s rostoucí dávkou roste výtěžek jednoduchých a dvojných zlomů DNA. V grafu 2 jsou zaneseny hodnoty počtu zlomů na plasmid v závislosti na dávce; tyto hodnoty jsou průměrem hodnot našich měření.



Graf 2: Závislost počtu zlomů v plasmidu na dávce.

4 Shrnutí

Zjistili jsme, že počet jednoduchých zlomů roste lineárně s dávkou, což neplatí u zlomů dvojných, kde ozáření tohoto plasmidu relativně malými dávkami ještě nedochází k významnější tvorbě těchto zlomů. Vyhodnocování je navíc zatíženo lidským faktorem.

Poděkování

Náš dík patří především naší ochotné supervisorce Viktorii Štísově, dále Ústavu jaderné fyziky za poskytnutí přístrojů a materiálu a organizačnímu týmu Fyzikálního týdne 2004 v čele s Vojtěchem Svobodou.

Reference:

- [¹] KOL. AUTORŮ: *Principy a praxe radiační ochrany*. Azin CZ, 2000, s. 156-158.
- [²] SPOTHEIM-MAURIZOT, M.: *DNA radiolysis by fast neutrons (Int. J. Radiat. Biol., Vol. 57, No. 2)*. Taylor & Francis, 1990, s. 301-313.
- [³] SAMBROOK, J – RUSSELL, D. W.: *Molecular Cloning*. CSHL Press, 2001.