

# Poškození DNA vlivem ionizujícího záření

David Paulů  
Gymnázium Jiřího Wolкера, Prostějov  
david\_paulu@seznam.cz

Zdeňka Ryšavá  
Gymnázium Matyáše Lercha, Brno  
zdenka.rysava@post.cz

Martina Černá  
Gymnázium Mikulov  
jullietka@centrum.cz

Lucie Coufalová  
Gymnázium Vídeňská, Brno  
luc.couf@seznam.cz

## Abstrakt:

Vlivem ionizujícího záření dochází k poškození DNA. Některá z těchto poškození se dají jednoduše měřit metodou agarózové elektroforézy. Vzorky DNA ve vodě byly ozářeny  $^{60}\text{Co}$  v intervalu 0-8 Gy. Změřili jsme množství jednoduchých a dvojných zlomů v ozářených vzorcích a zjistili jsme, že zlomů přibývá s rostoucí dávkou ozáření.

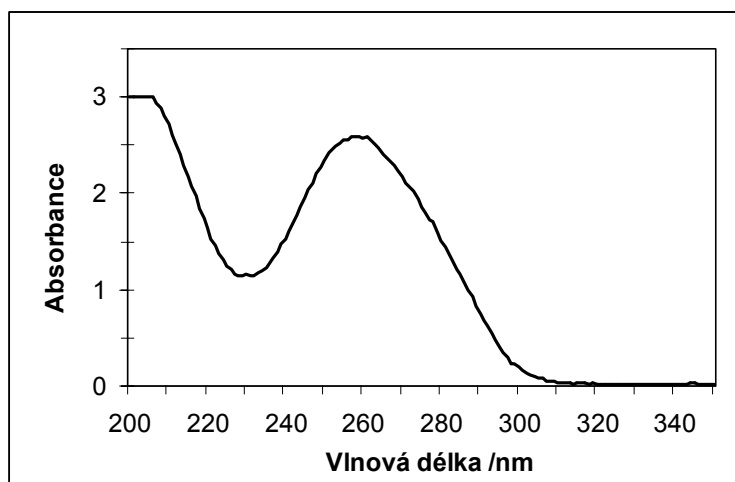
## 1 Úvod

Při ozáření ionizujícím zářením, jsou poškozeny jednotlivé části buněk. Poškození DNA je pro buňku kritické, protože buňka obsahuje pouze dvě kopie DNA a špatně opravené poškození ovlivňuje celý život buňky a jejích buněk dceřiných. Typickým poškozením DNA ionizujícím zářením jsou zlomy. Jsou jednoduché (SSB-*single strand breaks*), které změni nepoškozený stočený plasmid na kruhový, nebo dvojně (DSB-*double strand breaks*), které změni formu plasmidu na lineární. Tyto formy lze rozlišit metodou horizontální agarózové elektroforézy, protože v elektrickém poli migrují každá jinou rychlostí [1]. Výsledky elektroforézy jsme pozorovali nad UV lampou.

## 2 Stanovení množství SSB a DSB vzniklých ozářením DNA

Experimenty jsme prováděli na plasmidech pBS (*plasmid Bluescript II SK*), které se hojně používají k pozorování a klonování specifických sekvencí v biofyzice a molekulární biologii.

Za pomoci spektrofotometru GENESYS 6 jsme si nejdříve změřili pozadí (destilovaná voda) a potom absorbanci DNA, díky níž jsme posléze vypočítali koncentraci daného vzorku. Změřené hodnotě absorpance 2,578 při vlnové délce 260nm odpovídá 129 ng/μl DNA.



graf 1: Závislost absorbance na vlnové délce

Nachystali jsme vzorky o celkovém objemu 30  $\mu\text{l}$ , které obsahovaly 2,7  $\mu\text{l}$  DNA, 3  $\mu\text{l}$  0,1M roztoku KCl, 3  $\mu\text{l}$  0,1 M roztoku fosfátového pufru (1M  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  + 1M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) a 21,3  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ . Na základě současné aktivity zdroje  $^{60}\text{Co}$  byl určen čas ozařování vzorku pro dávku 0-8 Gy. Pro 2 Gy odpovídá doba ozařování 11min a 33 sec při vzdálenosti 20cm od zdroje.

Zatímco vzorky byly ozařovány, připravili jsme gel z agarózy (0,8%), roztoku TAE a dále pak 4  $\mu\text{l}$  barviva SYBR Green I (barvivo, které pokud je vázáno na DNA je fluorescenční). Tuto směs jsme přivedli k varu, vařící směs jsme nalili do forem, vytvořili jamky pro vzorky a nechali gel ztuhnout. Do ozářených vzorků jsme přidali modré barvivo s glycerolem. Tuto směs jsme následně pomocí pipety deponovali do jamek v agaru, který jsme umístili do horizontální elektroforézy naplněnou roztokem TAE. Vzorky jsme nechali migrovat po dobu 2,5 hodiny při napětí 100 V a proudu, který se se zvyšující teplotou zvyšoval. Výsledný gel jsme položili na transiluminační stůl a vyfotili digitálním fotoaparátem Olympus C720.

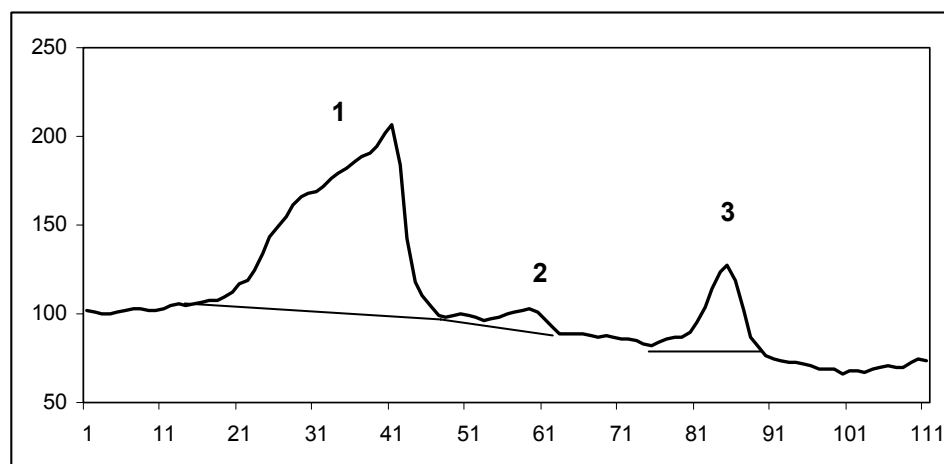
## 4 Výsledky

Při pohledu na gel s DNA pomocí UV lampy byly zřetelně vidět 3 peaky DNA a to podle toho, jak moc byly ozářeny. V grafu 2 je ukázán průběh intenzity fluorescence jednoho z ozářených vzorků. V peaku nejdále jamkám byly neporušené plasmidy DNA (peak 3 na grafu 2). Postupně se zvyšovalo množství molekul v prvním peaku - to byly molekuly kde byla porušena jedna ze dvou šroubovic a u největších dvou dávek ozáření se začíná objevovat i peak uprostřed (peak 2). V tomto případě byly porušeny obě šroubovice.

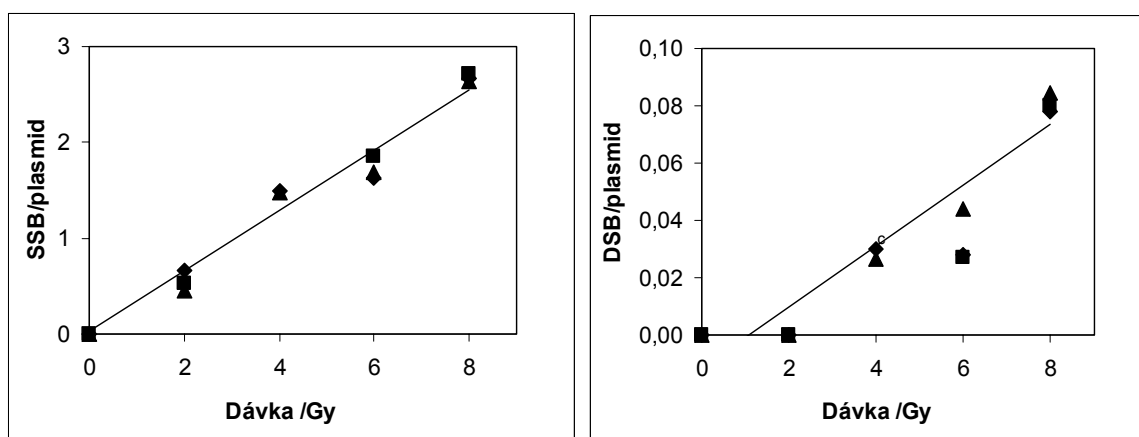
Analýzu vzorků jsme provedli pomocí softwaru ImageQuant. Takto jsme zjistili procentuální zastoupení lineární, kruhové a smotané DNA. Počet jednoduchých a dvojných zlomů na jeden plasmid jsme vypočetli pomocí vztahů:

$$\bar{x} = \ln[(1 - L')/S'] \quad \bar{y} = L'/(1 - S'),$$

kde  $\bar{x}$  je střední hodnota počtu jednoduchých zlomů,  $\bar{y}$  je střední hodnota počtu dvojných zlomů,  $L'$  je zastoupení lineární formy DNA a  $S'$  je zastoupení smotané formy DNA [2].



graf 2: Densitogram analyzovaného vzorku



grafy 3 a 4: Změřená množství jednoduchých a dvojných zlomů DNA v závislosti na dávce

## 5 Shrnutí

V grafech 3 a 4 jsou shrnuty výsledky našeho experimentu. Množství jednoduchých i dvojných zlomů DNA roste s absorbovanou dávkou záření. Dvojných zlomů je řádově méně, asi 40-krát. Při dávce 8 Gy byly téměř všechny plasmidy DNA poškozeny.

## Poděkování

Tímto bychom chtěli poděkovat především naší paní supervizořce Ing. Marii Davidkové CSc. a dále i Fakultě jaderné a fyzikálně inženýrské ČVUT v čele s realizačním týmem Fyzikálního týdně, kterému děkujeme za poskytnutí finanční podpory i kvalitního zázemí.

## Reference:

- [1] KIEFER, J.: *Biological Radiation Effect* Springer-Verlag, 1990, str. 104-111
- [2] SPOTHEIM-MAURIZOT, M.-CHARLIER, M. - SABATTIER, R. *DNA radiolysis by fast neutrons* Int. J. Radiat. Biol. 1990 57(2) 301-313