

Poškození DNA vlivem ionizujícího záření

J. Černohorská
Gymnázium Nymburk
jice@seznam.cz

M. Voráčová
Gymnázium J. G. Jarkovského, Praha
voracova.manuela@seznam.cz

Oddělení dozimetrie záření
Ústav jaderné fyziky, AV ČR, v.v.i.
Na Truhlářce 39/64, Praha 8, 18086

1 Abstrakt

Zkoumaly jsme poškození DNA účinkem ionizujícího záření. Metodou agarozové elektroforézy byl změřen výtěžek jednoduchých a dvojných zlomů v DNA plasmidu pro různé dávky gama záření.

2 Úvod

Makromolekula DNA je nejcitlivější částí buňky pro účinky různých toxinů ze životního prostředí včetně ionizujícího záření. Záření způsobuje celou řadu poškození, z nichž jsou nejdůležitější zlomy dvoušroubovice DNA. Zlomy jednoho řetězce je buňka schopna dobře opravit. Oprava dvojných zlomů je složitější a neopravené zlomy mohou být pro přežití buňky kritické. Pro změření množství zlomů vzniklých gama zářením jsme použily metodu agarózové elektroforézy. Ozářily jsme plazmidovou DNA, která při indukci zlomů řetězce mění svoji původní stočenou konformaci na kruhovou nebo lineární. V elektrickém poli migrují tyto konformace každá jinou rychlostí. Výsledky elektroforézy jsme pozorovaly nad UV lampou.

3 Postup

Experimenty jsme prováděly na plazmidech pCDNA3. Ke stanovení koncentrace daného vzorku DNA slouží přístroj spektrofotometr. Změřené hodnotě absorbance 2,3 při vlnové délce 260 nm odpovídá 115 ng/μl DNA.

Příprava gelu

Připravily jsme gel z agarózy, vody a barviva SYBR Green. Tuto směs jsme uvařily, nalily do forem, spacerem vytvořily jamky pro vzorky a gel nechaly ztuhnout.

Vzorky

Nachystaly jsme 6 vzorků o objemu 20 μl, které obsahovaly 3 μl DNA, 1,7 μl fosfátového pufru (1M K₂HPO₄·3H₂O + 1M KH₂PO₄) o koncentraci 100 mM a 15,3 μl vody.

Ozáření

Vzorky jsme ozařovali dávkami 0-10 Gy pomocí zdroje ^{60}Co . Vzorky byly ozařovány najednou, po ozáření 2 Gy byl vždy jeden vzorek vyndán. Jedna kontrolní zkumavka nebyla ozářena vůbec.

Deponování a elektroforéza

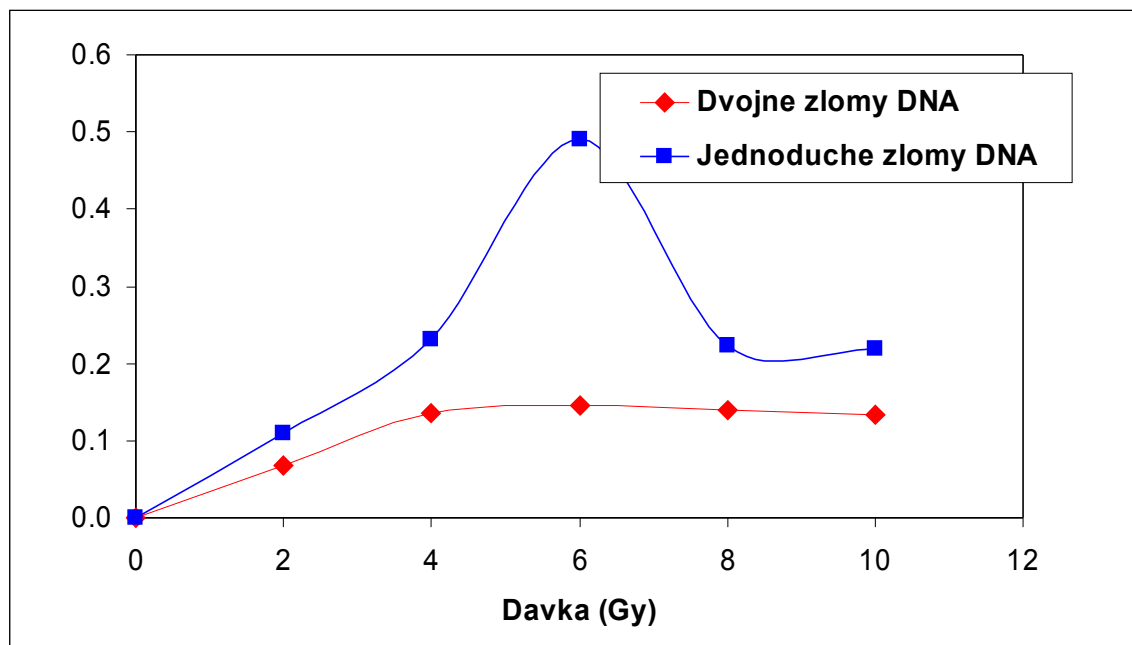
Poté jsme do ozářených zkumavek přidaly fluorescenční barvivo s glycerolem (pro zvýšení hustoty) a vytvořenou směs jsme pomocí pipety deponovali do jamek v gelu. Gel jsme umístily do elektroforézy a nechaly jí procházet stejnosměrný proud. DNA, nesoucí záporný náboj, začala migrovat ke katodě. Vzorky migrovaly 2 hodiny při napětí 150 V.

Nasvícení UV zářením

Po skončení elektroforézy jsme vzorky prosvítily UV zářením a výsledky nafotily fotoaparátem pro další zpracování na počítači.

4 Výsledky

Na fotografiích bylo vidět několik peaků DNA v závislosti na míře ozáření. Nejdále jamkám byly neporušené plazmidy DNA. Data jsme dokázaly zpracovat pomocí počítačové technologie a v programu Luthien jsme zjistily procentuální zastoupení lineární, kruhové a stočené DNA, vyhodnotily výsledky a z daných hodnot sestavily graf (viz. graf 1). S rostoucím množstvím gama záření rostlo i poškození šroubovice až do hodnoty 6 Gy, jak můžete vidět v grafu níže. Pro větší záření nám hodnoty nevyšly podle předpokladů, což pravděpodobně bylo zapříčiněno špatnou kvalitou fotografických snímků a malým počtem pokusů.



Graf 1: výtěžek jednoduchých a dvojných zlomů DNA

Poděkování

Rády bychom poděkovaly především naší supervizořce Ing. Marii Davidkové za příjemnou spolupráci, dále Fakultě jaderné a fyzikálně inženýrské ČVUT a týmu Týdne vědy.

Reference

- 1] ALPEN, E. L.: *Radiation Biophysic*, 2nd edition, ACADEMIC PRESS, 1990
- [2] BRAY A., LEWIS J., WALTER R.R.: *Základy buněčné biologie*, 2. vydání, Espero Publishing, s.r.o., 1998