

Mumie vs. zombie, aneb Na koho si vsadit v případě jaderné katastrofy?

E. Grolmusová¹, J. Frühauf²;
odborný garant Anna Michaelidesová

¹Bilingválne gymnázium Milana Hodžu, Sučany

²Gymnázium a SOŠ dr. Václava Šmejkal, Ústí nad Labem

Jardafrufu@seznam.cz

Erika.grolmusova@me.com

Abstrakt:

V tomto mimiprojektu jsme se snažili prozkoumat dopady ionizujícího záření na DNA ve vysušeném (mumie) a v hydratovaném stavu (zombie) použitím izolované plasmidové DNA. Výsledků bylo dosaženo vystavením plasmidové DNA různým dávkám gama záření. Vzorky byly vyhodnoceny pomocí metody agarózové gelové elektroforézy. Z našich výsledků vyplývá, že suché DNA, tedy mumie, je odolnější než DNA v vodním roztoku, tedy zombie.

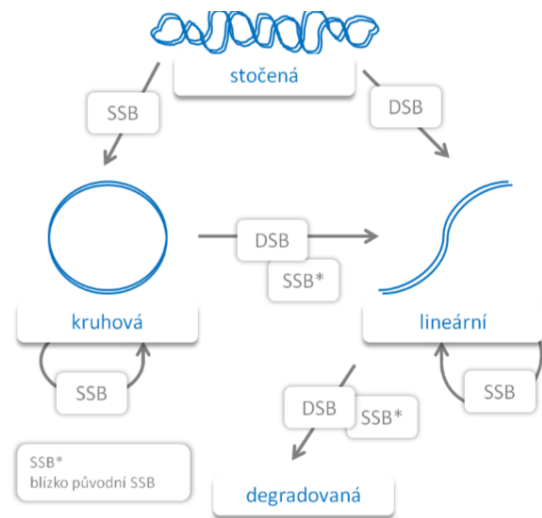
1 Úvod

Buňka je základním stavebním kamenem organismu a je složena z 40-60 % z vody. V jádře buňky se vyskytuje chromosomová DNA, neboli deoxyribonukleová kyselina. DNA je považována za nejcitlivější část buňky, závisí na ní totiž stav celého organismu. DNA může být kromě chromosomální i plasmidová, která se vyskytuje v bakteriích.

Plasmidová DNA se vyskytuje ve 3 různých konformacích:

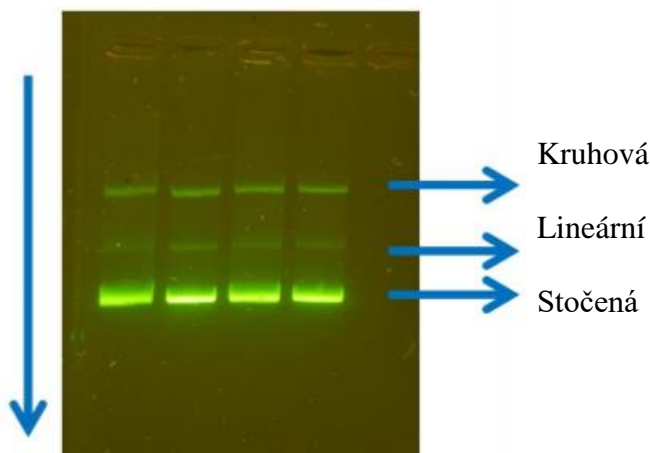
- stočená
- kruhová neboli relaxovaná
- lineární.

Zdravá plasmidová DNA je ve stočené konformaci, a jak je vidět na obrázku 1, v případě přerušení pouze jednoho řetězce DNA vzniká konformace kruhová a při dvojném zlomu vzniká konformace lineární. V případě přerušení molekuly na více místech hovoříme o degradované DNA. Tyto konformace je možné rozdělit pomocí metody gelové agarózové elektroforézy, což je znázorněné na obrázku 2.



Obrázek 1: Vznik jednoduchého a dvojného zlomu dvoušroubovice DNA (Převzato z [1]).

rozdělit pomocí metody gelové agarózové elektroforézy, což je znázorněné na obrázku 2.



Existuje několik faktorů, které mohou DNA poškodit. Jedním z nich je ionizující záření. Ionizující záření může interagovat s molekulou DNA přímo či nepřímo díky reaktivních produktům při radiolýze vody.

Naším úkolem bylo prozkoumat, zdali se vysušená DNA poškodí vlivem záření více nebo méně než DNA v tekutém stavu, proto Mumie versus Zombie.

Obrázek 2: Rozdělení tří konformací plasmidové DNA metodou gelové agarózkové elektroforézy.

2 Postup

Použitá plasmidová DNA

Pro přípravu vzorků DNA byla použita plasmidová DNA typu pBR322. Molekula tohoto plasmidu je složena z 4361 bázových párů.

Příprava gelu

Pro přípravu agarózkového gelu se navážilo do kádinky 0,4 g agarózy a přidalo se 40 ml solného roztoku TAE 0,5X. Kádinka se poté vložila do mikrovlnné trouby a minutu se tekutina nechala vařit, dokud se agarózkový prášek nerozpustil. Po minutě, se kádinka přesunula na vařič, kde byla tekutina ještě povařena při stálém míchání. Dále se do uvařeného gelu přidaly 4 ul SYBR green, který slouží ke zviditelnění DNA pod UV lampou. Uvařený gel se poté přelil do formy s hřebínkem a nechal se hodinu chladit, aby ztuhl.

Vzorky

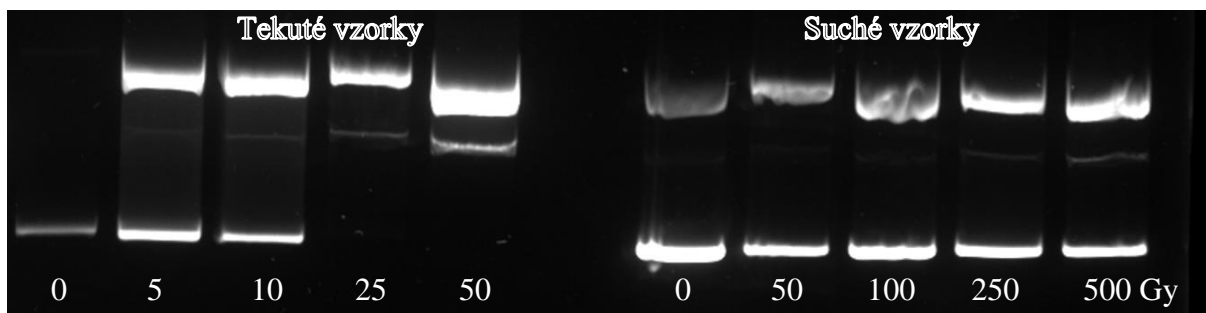
Suché vzorky byly připraveny a ozářeny den předem, vždy se 150 ng DNA na 3 μ l, dále rozděleno do dvou kapek po 1,5 μ l, ty se nechaly 30 minut sušit. Po ozáření byly rozpuštěny v 10 μ l destilované vody a 2 μ l barviva. Tekuté vzorky byly připraveny po 10 μ l s 2,3 μ l plasmidu, které odpovídalo 100 ng DNA a po ozáření se dodaly 2 μ l barviva.

Ozařování

Vzorky jsme vystavili různým dávkám gama záření ze zdroje ^{60}Co s dávkovým příkonem $0,0484 \text{ Gy} \cdot \text{s}^{-1}$ v 5 cm ve vodě. Ozařování bylo provedeno v různých vzdálenostech pro ušetření času, suché vzorky byly umístěny na Petriho miskách a ozářeny dle čtvercového zákona a tekuté vzorky ve vodním fantomu, tudíž ve vzdálenostech dle kombinace čtvercového zákona a absorpce vody. Suché vzorky byly ozářeny dávkami 0, 50, 100, 250, 500 Gy po dobu 2 hodiny a tekuté dávkami 0, 5, 10, 25, 50 Gy po dobu 15 minut.

Elektroforéza

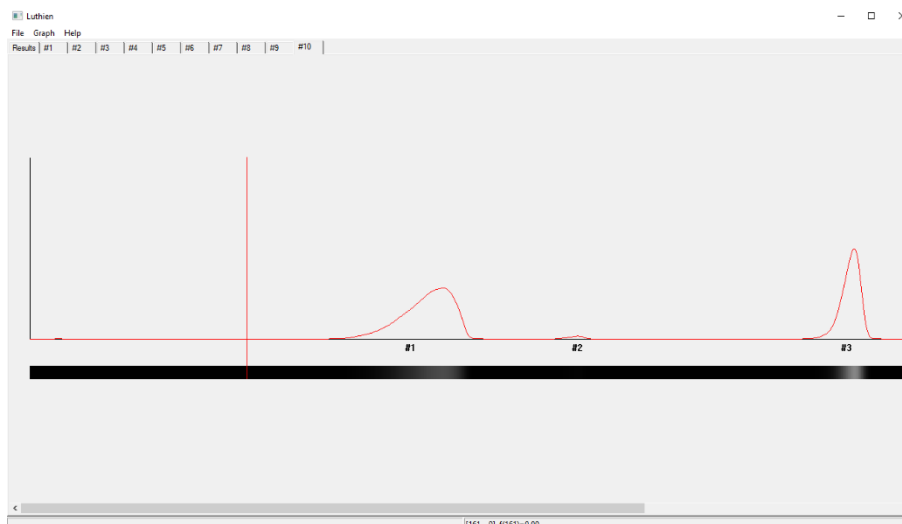
Po ozáření jsme vzorky pomocí pipet deponovali do jamek v gelu a ten jsme umístili do elektroforézy při napětí 100 V na 60 minut. DNA, nesoucí záporný náboj, začala migrovat ke katodě a rozdělila se do svých různých konformací. Po ukončení elektroforézy jsme gel vystavili UV záření a vytvořili fotografie pro analýzu výsledků programem Luthien.



Obrázek 3: Výsledný gel pod UV zářením.

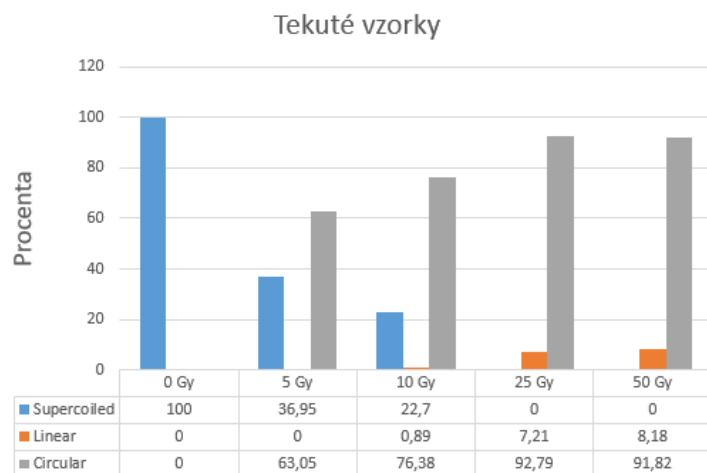
3 Výsledky

V programu Luthien se vždy vybrala oblast zájmu na gelu, tzn. jeden vzorek. Dle vybrané oblasti se v programu vykreslilo spektrum odpovídající danému vzorku. Příklad takového spektra je na obrázku 4. Toto spektrum znázorňuje množství dané konformace DNA v gelu.

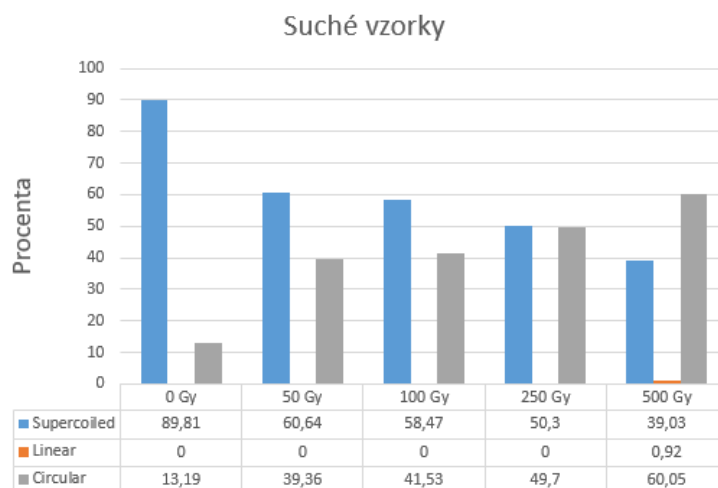


Obrázek 4: Množství DNA v různých konformacích znázorněné spektrem.

Píky ve spektru se pak označí a zintegrují, tím se získají hodnoty zastoupení různých konformací DNA ve vzorku. Bylo vyhodnoceno, že se počet stočených molekul DNA snižuje se zvyšující dávkou, mezitím se počet kruhových a lineárních molekul zvyšuje. Výsledky jsou vyobrazeny na obrázcích 5 a 6.



Obrázek 5: Výsledky integrace pro tekuté vzorky.



Obrázek 6: Výsledky integrace pro suché vzorky.

4 Shrnutí

Obecně jsme vypořizovali zvyšující se poškození DNA se zvyšující se dávkou. Největší poškození plasmidové DNA bylo vypořizováno při ozáření v tekutém prostředí, z toho vyplývá, že spíše bychom si měli vsázet na mumie.

Poděkování

Děkujeme ÚJF AV ČR za zrealizování miniprojektu, FJFI ČVUT za plánování Týdne Vědy a Anně Michaelidesové za dozor a odborné garantování

Reference:

[1] ANNA MICHAELIDESOVÁ *DNA a radikály* 2013 Strana 3