

DNA a radikály

V. Humhalová¹, M. Ježek²,
M. Koutová³, J. Mrázová¹, M. Suchá⁴, J. Talanda^{5,*}

¹Gymnázium Příbram,

²Gymnázium Česká Lípa,

³Gymnázium Česká a Olympijských nadějí

⁴GSOŠ Klášterec nad Ohří

⁵Masarykovo gymnázium a Jazyková škola s právem státní jazykové zkoušky Vsetín

*E-mail: kuba.talanda@seznam.cz

Abstrakt:

Cílem úlohy bylo zjistit, zda je DNA poškozeno více při suché či tekuté formě. Vzorky byly ozářeny zářením gama z kobaltového ozařovače a vyhodnoceny gelovou elektroforézou a programem Luthien. Bylo zjištěno, že tekuté vzorky byly mnohem více poškozené než vzorky suché v důsledku interakce radikálů vzniklých ve vodě při ozařování.

1 Úvod

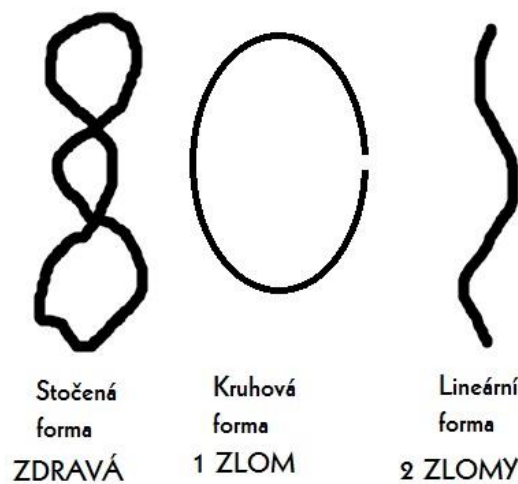
DNA (deoxyribonukleová kyselina) je tvořena třemi základními chemickými komponenty – sacharid zvaný deoxyribóza, na který se vážou dusíkaté báze – adenin, cytosin, guanin, thymin a fosfátu. Souborem těchto látek je řetězec zvaný nukleotid. Každé dva nukleotidy jsou mezi komplementárními páry spojeny vodíkovými můstky a stočeny do typické dvoušroubovice. Ta je v důsledku různých chemických vazeb uspořádána do složitějších smotaných struktur u chromozomální DNA a do kruhu u plasmidové DNA (menší kruhové molekuly vyskytující se především v cytosolu bakterií, samostatně se replikující a nesoucí některé doplňkové informace) se kterou budeme pracovat.

Naším úkolem bylo zjistit, jestli je vlivem záření více poškozena DNA sušená, nebo v tekuté formě. V případě ozáření DNA ionizujícím zářením způsobí energie absorbovaná buňkou excitaci a ionizaci různých buněčných molekul podél trajektorie letící částice (tzv. fyzikální stadium, asi 10^{-14} až 10^{-10} s). Vytvořené ionty, radikály a excitované atomy interagují mezi sebou a dalšími molekulami, což může způsobit různé poškození struktur buňky (chemické stadium, 10^{-3} -10s). Škody takto vzniklé mohou vést ke změnám v celé buňce a organismu, což může trvat stovky sekund až roky (biologické stadium).

Mezi tyto nebezpečné částice patří H^+ , OH^- , H_3O^+ a H_2O_2 . Z nich nejnebezpečnější je právě hydroxylový anion (radikál, OH^-). Samotná DNA je vůči oxidačnímu poškození zranitelná, může u ní dojít k přelámání dvoušroubovice – vznikají buď zlomy jednoduché nebo dvojně. Poškození dusíkatých bází vede obvykle k uvolnění původních vodíkových vazeb, v důsledku čehož můžou vnikat vazby nové, ať už v rámci jedné molekuly DNA nebo i s cizími molekulami, čímž vznikají takzvané crosslinks. Většina oxidačně způsobených poruch je sice opravena, ale v případě neúspěšné opravy mohou vyvolat mutace a chromozomální poškození.

Molekuly DNA jsou jak známo nabitý záporným nábojem, z čehož vychází princip elektroforetických metod, neboť v případě umístění DNA do elektrolytu se její molekuly začnou zákonitě pohybovat směrem ke katodě. Na molekulu však kromě přitažlivé síly elektrod ($F = Q \cdot E$, kdy E je jednotková intenzita pole a Q náboj) působí i odporová síla prostředí ($F = k \cdot v$, kde k je koeficient závislý na tvaru a velikosti částice a též na viskozitě prostředí), v našem případě se jedná o agarový gel. Se vzrůstající rychlostí tím pádem roste i odporová síla, až se obě síly vyrovnají a těleso se pohybuje konstantní rychlostí a jeho pohyblivost je možno vyjádřit vztahem (1):

$$\mu = v/E = Q/k \quad (1)$$



Obr. 1: Různé konformace plasmidové DNA

V tomto prostředí se nejrychleji pohybuje nepoškozená stočená forma, dále pak lineární forma (DSB - dva zlomy) a nejpomaleji forma kruhová (SSB – jednoduchý zlom).

2 Postup při práci

1. Příprava vzorků

Připravili jsme si dvě sady vzorků, které obsahovaly 100 ng DNA (plasmid pBR322) ve vodě o celkovém objemu 8 μ l. První sadu jsme ozářili ve vodě a druhou sadu jsme nakapali na krycí sklíčko upevněné na Petriho misce a nechali uschnout. Vyrobili jsme takto tenkou vrstvu suché DNA, kterou jsme poté ozářili.

2. Příprava gelu pro elektroforézu

Pro přípravu 1% agarozového gelu jsme použili 40 ml TAE 0,5x a 0,4 g agarózy. Roztok byl následně přikryt alobalem a dali jsme ho povařit, dokud se nevyčeřil. Následně jsme ho schladili na 60°C a přidali jsme fluorescenční barvivo SYBR Green I v poměru 1:10 000. Poté byl roztok vlit do formy, aby ztuhl.

3. Ozařování vzorku

Vzorky tekuté jsme ozařili na zdroji ^{60}Co dávkou 2, 5, 10 a 20 Gy a suché dávkami 20, 50, 100, 200 Gy. Určili jsme si dobu ozařování pro suché vzorky 12 hodin a tekuté vzorky 30 minut a na základě čtvercového zákona byly vypočítány vzdálenosti pro ozařování. Vzorky byly tedy ozařeny za stejných podmínek.

4. Elektroforéza

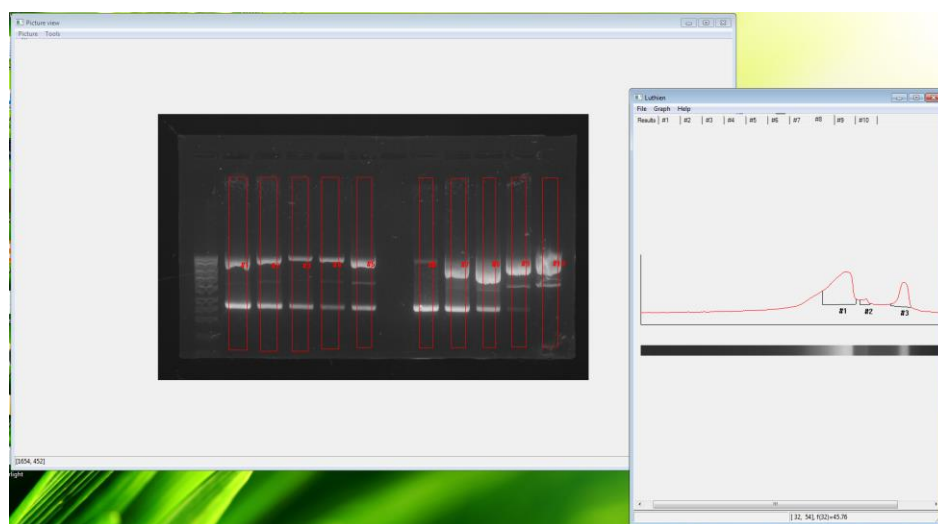
Ztuhlý gel jsme přesunuli do horizontální lázně, kterou jsme vyplnili 0,5x TAE pufrem. Do každého vzorku byly přidány 2 μl barviva a rychle jsme nanесли vzorky na gel v definovaném pořadí (každý do jedné jamky). Elektrody jsme zapojili tak, aby DNA migrovala na gelu ve správném směru, tj. ke katodě. Použili jsme napětí 100 V a čas 60 minut.

5. Zobrazení gelu

Gel jsme opatrně vyjmuli z lázně a nasníмали jej v temné komoře při osvětlení UV zářením (za použití ochranných brýlí).

6. Vyhodnocení

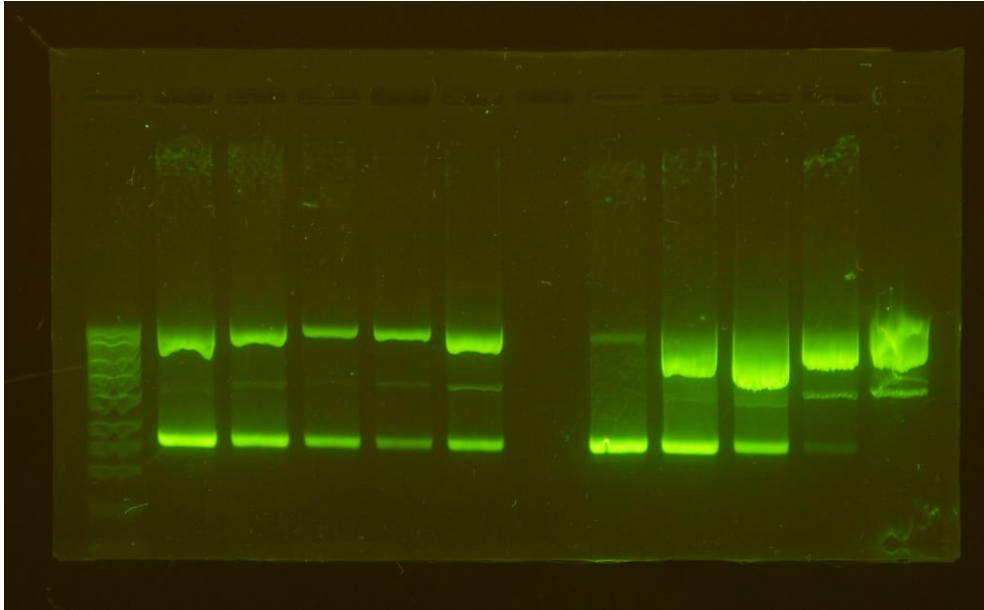
Pro vyhodnocení míry poškození DNA jsme použili program Luthien. Který nám na základě pořízeného gelu procentuálně určí zastoupení různých forem DNA v daném vzorku. Názorná ukázka na obr.2.



Obr.2: Vyhodnocování programem Luthien

3 Shrnutí

Z vyhodnocení vzorků je jasně patrné, že vzorky DNA obsahující vodu byly daleko více poškozené, než vzorky suché, které byly ozařovány daleko delší dobu. Tato skutečnost byla zjevně způsobena tím, že u suchých vzorků nebylo možné poškození vzniklé kvůli radikálům, iontům a dalším látkám, které vznikly z vody u vzorků tekutých. S rostoucí dávkou záření také rostla koncentrace poškozených forem DNA (viz. obr. 3).



Obr. 3: UV snímek gelu po vystavení DNA prostředí elektrolytu

Jak již bylo řečeno, v případě ponoření gelu do elektrolytu se nejrychleji pohybuje forma stočená, poté lineární a nejpomaleji kruhová. To je na obrázku rovněž patrné, neboť s rostoucí dávkou záření postupně klesá množství zdravé DNA a u nejvyšších dávek není na fotografii zdravé DNA téměř vůbec viditelné.

Poděkování

Rádi bychom poděkovali Ing. Anně Michaelidesové za pomoc a péči, kterou nám věnovala při zpracovávání tohoto projektu, stejně jako za poskytnutí vhodných zdrojů pro zpracování teoretické části a samozřejmě za to, že jsme se naučili něco nového.

Reference:

1. von Sonntag, C.: Free-radical-induced DNA damage and its repair, a chemical perspective, Springer, Heidelberg 2006.
2. Mozumder, A. and Hatano, Y.: Charged particle and photon interactions with matter, chemical, physicochemical, and biochemical consequences with applications, Marcel Dekker, Inc., New York 2004.
3. Kuna, P. and Navrátil, L.: Klinická radiobiologie, Manus, Praha 2005.
4. Garfin, D.E.: Electrophoretic methods, Academic Press, 2000.