

Jak chránit DNA před zářením

R. Čermák¹, V. Kanclíř², J. Kratochvíl³

¹Gymnázium F. V. Sasinka, Námestie slobody č. 3, Skalica

²Gymnázium Turnov, Jana Palacha 804, Turnov

³Gymnázium, Vídeňská 47, Brno

rastislav.cermak@gmail.com, VitKanclir@seznam.cz,
jirikrat@atlas.cz

Abstrakt:

Seznámili jsme se s metodou agarózové elektroforézy. Prozkoumali jsme, jak přítomnost různých sloučenin (vychytávačů) zmenšuje riziko poškození plasmidové DNA ionizačním zářením.

1 Úvod

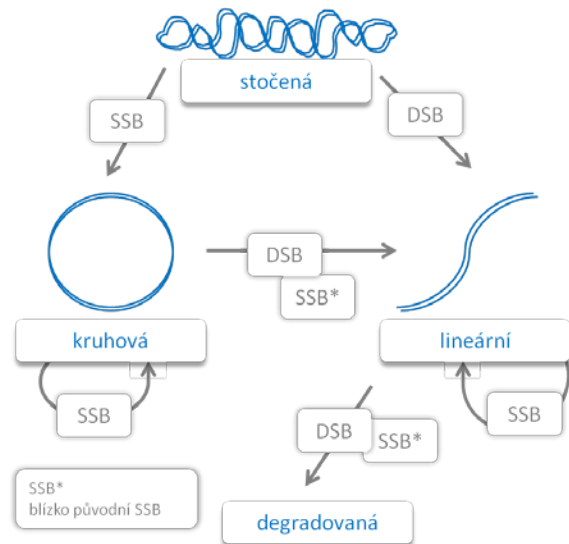
Rakovina je jedna z nejčastějších příčin úmrtí. Jeden z faktorů ovlivňujících vznik rakoviny je také ionizující záření, jehož nezanedbatelným zdrojem je kosmické záření. V dnešních dobách, kdy člověk chce objevovat vzdálený vesmír na vlastní kůži, je třeba zkoumat metody jak ochránit kosmonauty před následky záření.

Z hlediska dopadů záření na organismus je zásadním terčem zejména DNA, jejíž poškození může mít fatální následky pro konkrétní buňku i pro celý organismus, zatímco radiční poškození bílkovin a dalších součástí buňky je většinou rychle kompenzováno syntézou nových molekul. Existují dva druhy poškození DNA. Přímé poškození (tj. přímá interakce DNA s γ zářením) je relativně málo časté. Nepřímé poškození je poškození zprostředkované přes produkty radikálových reakcí vody. Nepříznivé působení volných radikálů může být redukováno přítomností tzv. vychytávačů neboli scavengerů. Schopnost zachytit volné radikály jsme otestovali u sloučenin: dimethyl sulfoxid, kumarin-3-karboxylová kyselina a glycyglycin.

2 Materiály a metody

Při studiu radiačních poškození DNA i bílkovin se vedle iontové chromatografie a hmotnostní spektrometrie často využívají elektroforetické metody. Jejich princip spočívá v rozdílné pohyblivosti nabitých molekul v elektrickém poli. Při separaci bílkovin a nukleových kyselin nebo jejich fragmentů je to nejpřesnější dostupná metoda. Za objev elektroforetické separace bílkovin krevního séra obdržel v roce 1948 švédský chemik Arne Tiselius Nobelovu cenu.

K našemu výzkumu jsme použili plazmidovou (extrachromozomální, samostatně se replikující kruhovou) DNA. Když vystavíme DNA ionizujícímu záření, může dojít buďto k jednoduchému zlomu, kdy se stočená forma DNA změní na kruhovou, nebo dvojnému zlomu, jehož následkem je vznik lineární formy (Obr. 1). Když se zvýší dávka záření, přibývá zlomů DNA, přibývají i kruhové a lineární formy.



Obr. 1

3 Laboratorní postup

Příprava vzorků

Připravili jsme si tři sady po třech vzorcích, které obsahovaly 100 ng DNA v 20 mM fosfátového pufru a celkový objem jsme vždy doplnili vodou do 10 μ l. První vzorek neobsahoval žádný vychytávač, další dva různé koncentrace vychytávačů (scavengerů) dle tabulky:

sada č.	scavenger	koncentrace
1	K3KK	0.001 M a 0.01 M
2	DMSO	0.1 M a 1M
3	GlyGly	0.1 M a 1 M

Příprava gelu pro elektroforézu

Připravili jsme si 40 ml 1 % agaróзовého gelu v 0.5 x TAE pufru. Roztok jsme přikryli alobalem a za stálého míchání povařili, dokud se nevyčeřil. Poté jsme ho nechali chladnout až na 60 °C. Přidali jsme fluorescenční barvivo SYBR Green I v poměru 1:10 000 a promíchali, vliili do příslušné formy, zamezili přístupu světla, protože SYBR je citlivý na světlo, a nechali ztuhnout.

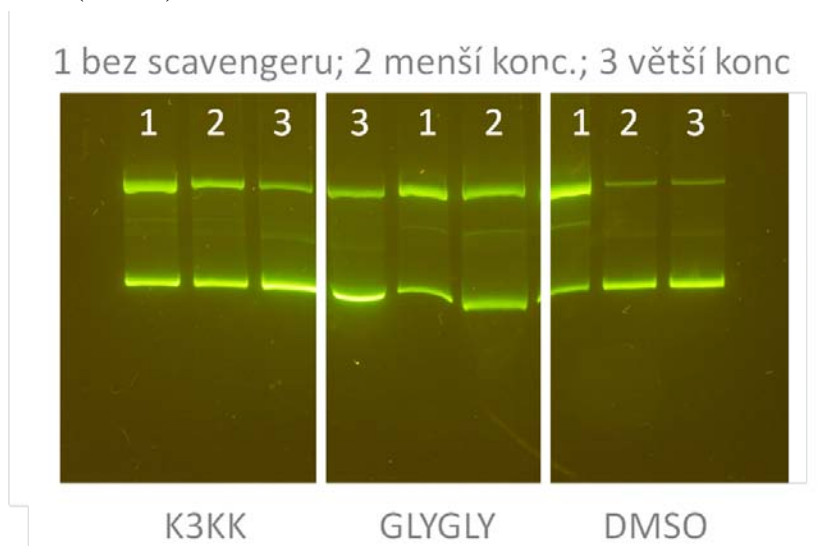
Ozařování vzorku kobaltem-60

Vzorky jsme ozařovali na zdroji ^{60}Co s poločasem rozpadu 1925,5 dnů dávkou 10 Gy ve vzdálenosti 0,293 m na vzduchu za pokojové teploty, přičemž . Pro výpočet doby potřebné k ozařování vzorku (28 minut a 8 sekund) jsme použili následující vztah:

$$t_o = \frac{D}{\dot{D}_0 e^{-\frac{\ln 2}{T_{1/2}} \cdot t}}$$

Elektroforéza

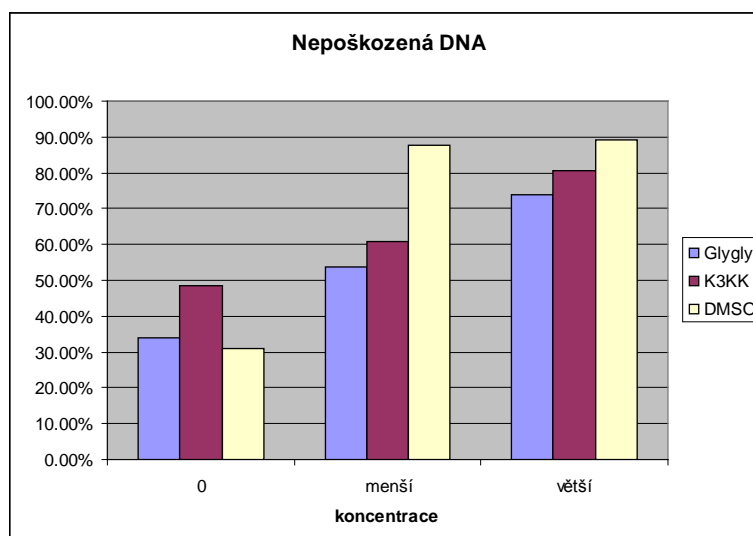
Ztuhlý gel jsme přesunuli do horizontální lázně s 0.5 x TAE pufrem. Do každého vzorku jsme přidali nanášecí barvivo. Poté jsme nanášeli vzorky na gel v definovaném pořadí. Elektrody jsme zapojili tak, aby DNA migrovala na gelu ve správném směru. Nastavili jsme 100 V napětí. Elektroforéza trvala 60 minut. Gel jsme opatrně vyndali z lázně a vyfotili v temné komoře na UV stolku (Obr. 2).



Obr. 2

4 Výsledky a diskuse

Seznámili jsme se s metodou elektroforézy a dokázali jsme, že zkoumané látky do jisté míry ochrání plasmidovou DNA před zářením. Tato schopnost není lineárně závislá na koncentraci scavengeru. (Obr. 3). Při vyhodnocování gelu (Obr. 2) programem Luthien však mohlo dojít k chybě způsobené nepřesností agaróзовé elektroforézy. Vzorky bez vychytávačů se poměrně dost liší, což je pravděpodobně způsobeno naší chybou při nanášení vzorků na gel.



Obr. 3

5 Závěr

Skutečnost, že některé látky jsou schopné pohlcovat radikály vzniklé při ozáření nám umožňuje chránit DNA v prostředí se zvýšeným rizikem výskytu záření. Z námi zkoumaných látek byl nejúčinnějším scavengerem kumarinový derivát. Ač z grafu vyplývá, že nejúčinnějším je DMSO, je třeba si uvědomit, že kumarinový derivát byl užit ve stokrát menší koncentraci.

6 Poděkování

Chtěli bychom poděkovat naší supervizořce Ing. Kateřině Pachnerové Brabcové, PhD. za ochotu a pomoc při projektu a také Oddělení dozimetrie záření ÚJF AV ČR a pořadatelům Týdne vědy.

7 Reference:

1. Kuna, P. and Navrátil, L.: Klinická radiobiologie Manus, Praha 2005.
2. Garfin, D.E.: Electrophoretic methods, Academic Press, 2000.,