

Ochrání alkohol DNA před zářením?

M.Grunerová¹, B. Odložilík², J. Vondráček³

¹ Gymnázium Broumov, Hradební 218, Broumov

² Ekogymnázium Brno, Labská 27, Brno

³ Gymnázium Děčín, Komenského náměstí 4, Děčín

martina.grunerova@seznam.cz, B.odlozilik@seznam.cz, j.vondracekk@centrum.cz

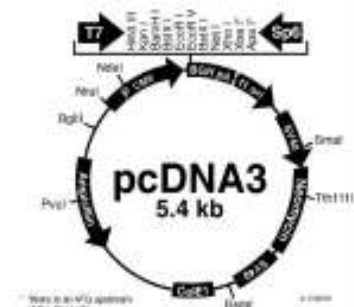
Zkoumali jsme vliv ethanolu na ochranu DNA před ionizujícím zářením. K výzkumu jsme použili metodu agarózové elektroforézy. Vytvořili jsme čtyři sady po šesti vzorcích. Ve vzorcích se nacházely různé koncentrace ethanolu. Každou sadu jsme ozařovali různou dávkou ionizujícího záření. Zjistili jsme, že rostoucí koncentrace ethanolu je účinnou ochranou poškození DNA.

1 Úvod

Molekula DNA je nositelkou genetické informace, a tudíž na míře jejího poškození závisí přežití buňky, respektive celého organismu. Ionizující záření poškozuje DNA buď přímo, tj. interakcí ionizující částice s molekulou DNA, nebo nepřímo prostřednictvím produktů radiolýzy vody. Výsledkem jsou v obou případech zlomy DNA (jednoduché i dvojité), ale také poškození bází, cross-linky uvnitř DNA nebo mezi DNA a proteiny. Protože buňka je z velké části tvořena vodou, většina poškození vzniká nepřímo v důsledku přítomnosti hydroxylových radikálů, které vznikají při radiolýze vody. Nepříznivé působení volných radikálů může být redukováno pomocí tzv. vychytávačů (scavengerů), například vitaminy C a E, nebo alkoholy.

2 Materiály a metody

Plasmid je extrachromozomální, samostatně se replikující kruhová DNA. Zpravidla ji tvoří 1000 až 400 000 bázových párů. My jsme použili plasmid pcDNA3 obsahující 5446 bázových párů, viz. obr. 1.



Obr. 1 Plasmid pcDNA 3 [1]

Ozařování probíhalo na zdroji ⁶⁰Co umístěném na Oddělení dozimetrie záření ODZ ÚJF AV ČR. Každý vzorek obsahoval 100 ng plasmidu pcDNA3 v 10 mM fosfátovém pufru. Vzorky v polypropylenových tubičkách byly ozařovány při pokojové teplotě.

Agarózová gelová elektroforéza je jedna ze základních metod v radiobiologii. U plasmidové DNA lze po ozáření rozlišit tři formy:

- Stočená bez zlomů (supercoiled)
- Relaxovaná s jednoduchým zlomem (SSB Single-strand break)
- Lineární s dvojitým zlomem (DSB double-strand break)

Tyto formy se liší svou pohyblivostí v elektrickém poli na agarózovém gelu. Se zvyšující se dávkou záření přibývá zlomů DNA, přibývají i relaxované a lineární formy.

3 Laboratorní postup

3.1 Příprava vzorků

Připravili jsme si čtyři sady po šesti vzorcích. Každý vzorek obsahoval 0,6 μ l roztoku plasmidové DNA s optickou hustotou 2,5, 1 μ l 10 mM fosfátového pufru, 1 μ l ethanolu o různé koncentraci (viz. Tabulka 1) a doplníme do 10 μ l autoklávovanou destilovanou vodou.

Tabulka 1 Použité koncentrace roztoku ethanolu

<i>Vzorek č.</i>	<i>Koncentrace ethanolu</i>
1	1%
2	0,1%
3	0,01%
4	0,001%
5	0,0001%
6	0,00%

3.2 Ozařování vzorků

Vzorky jsme ozařovali na zdroji ^{60}Co následujícími dávkami ve vzdálenosti 0,293 m na vzduchu za pokojové teploty. (viz. Tabulka 2)

Tabulka 2 Dávky ozáření jednotlivých skupin vzorků

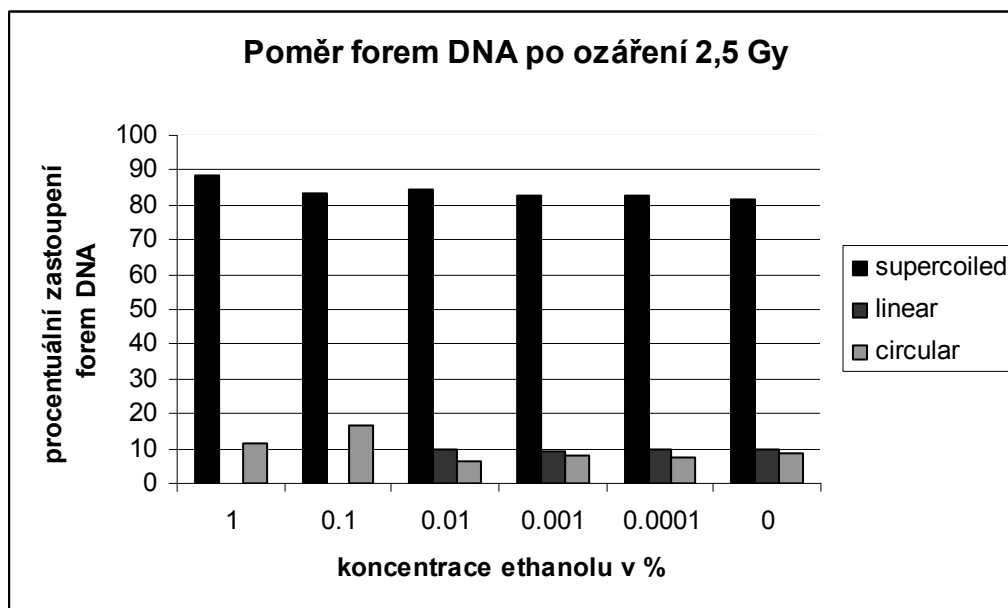
<i>Série vzorků č.</i>	<i>Dávka ^{60}Co</i>	<i>Čas ozařování</i>
I	0 Gy	0
II	2,5 Gy	7 min. 20 sek.
III	5 Gy	14 min. 40 sek.
IV	10 Gy	29 min. 20 sek.

3.3 Elektroforéza

Připravili jsme 100 ml 1% agarózového gelu v 0,5 x TAE. Roztok jsme za stálého míchání vařili dokud se nestal čirým. Poté jsme ho nechali zchladnout na 60°C. Dále jsme přidali barvivo SYBR Green I v poměru 1 : 10 000 a promíchali. Gel jsme nalili do formy a nechali ztuhnout. Ztuhlý gel jsme přesunuli do horizontální lázně, kterou jsme vyplnili 0,5 x TAE pufrům. Do každého vzorku jsme přidali 2μl nanášecího pufru a rychle jsme nanášeli vzorky na gel v předem určeném pořadí. Elektrody zapojíme tak, aby DNA migrovala ve správném směru. DNA má záporný náboj a bude se tedy pohybovat směrem ke katodě. Napětí jsme nastavili na 100 V. Elektroforéza trvala cca hodinu. Poté jsme gel opatrně vyndali z lázně a vyfotili v temné komoře na UV světle.

4 Výsledky a diskuse

Výsledky jsme vyhodnotili programem Image Quant. Některé vzorky ozářené 5 a 10 Gy se nezobrazily kvůli špatné aplikaci. Uvedeme tedy pouze výsledky vzorků ozářených 2,5 Gy (viz. Obrázek 2).



Obrázek 2 Poměr forem DNA po ozáření 2,5 Gy

Z výsledků, které vidíme na grafu je patrné, že při klesající koncentraci ethanolu přibývá poškozené DNA. Mezi poškozenou DNA převládá kruhová forma (circular) s jedním zlomem. Při nižších koncentracích ethanolu se objevuje lineární forma se dvěma zlomy.

Pokus ukázal, že ethanol má vliv na ochranu DNA před ionizujícím zářením – vzorky s vyšší koncentrací ethanolu byly méně poškozeny než vzorky s nižší koncentrací.

5 Poděkování

Chtěli bychom poděkovat našim supervisorkám Ing. Viktorii Madhusudhan Štísové, PhD. a Ing. Kateřině Pachnerové Brabcové, PhD. za ochotu a pomoc při projektu, dále ODZ ÚJF AV ČR a samozřejmě také pořadatelům Týdne vědy na ČVUT v Praze.

6 Reference:

[1] <http://www.ionchannels.org>

[2] SAMBROOK - RUSSEL: *Molecular cloning vol.3* CSHL Press, 2001