

# DNA a radikály

Anna Martincová<sup>1</sup>, Eliška Radová<sup>2</sup>, Adriena Redlová<sup>3</sup>, Michal Drahozal<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Gymnázium Trutnov, Jiráskovo náměstí 325,

<sup>2</sup>Gymnázium Česká a Olympijských nadějí, Česká 64, České Budějovice,

<sup>3</sup>Gymnázium, Brno, Slovanské náměstí 7,

<sup>4</sup>Gymnázium Česká Lípa, Žitavská 2969

<sup>3</sup>e-mail: redlova.adriena@gmail.com

## Abstrakt:

Nejdůležitější částí buňky je její jádro, které obsahuje nositelku genetické informace: DNA. Tato molekula může být poškozena různými faktory, například ionizujícím zářením. Byly ozářeny dvě sady vzorků: suché a tekuté. Po vyhodnocení gelovou elektroforézou bylo zjištěno, že DNA v tekuté formě byla po ozáření poškozena více než ve formě suché.

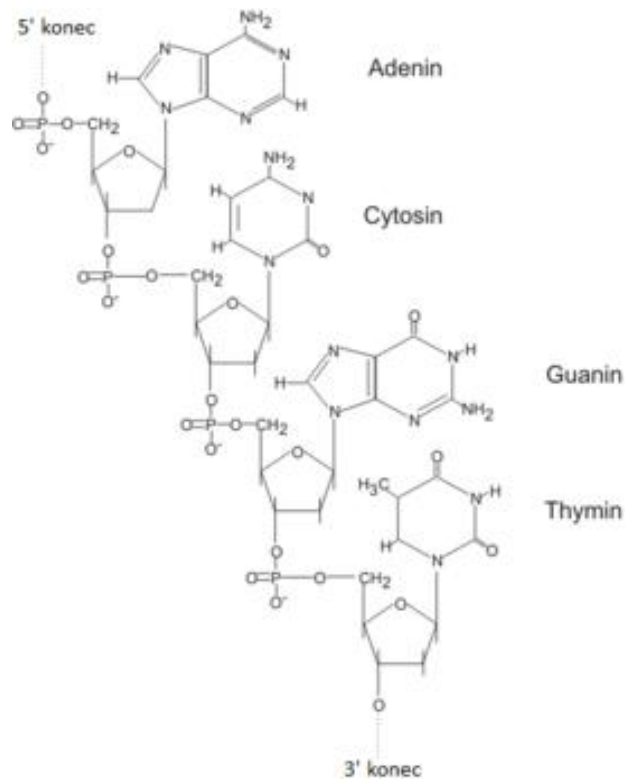
## 1 Úvod

Buňka je základní stavební a funkční jednotkou živých organismů. Obsahuje anorganické i organické látky; hlavně vodu, bílkoviny, tuky, sacharidy a nukleové kyseliny. Co je v naší problematice nejdůležitější; buňky obsahují velké množství vody (asi 60 – 90%). Obsah vody hraje důležitou roli při ozáření. Naším úkolem bylo zjistit, jak významná tato role je.

Při ozařování organismu hraje nejdůležitější roli poškození DNA. DNA je nositelka genetické informace všech živých organismů. Je tvořena nukleotidy, které se skládají ze sacharidu, fosfátu a dusíkaté báze (adenin, cytosin, guanin, thymin). Znázornění DNA je na obrázku 1.. Každé dva nukleotidy jsou mezi komplementárními páry spojeny vodíkovými můstky a stočeny do dvoušroubovice. Ta je u chromozomální DNA uspořádána do složitějších smotaných struktur a u plasmidové DNA do kruhu. Plasmidová DNA je pro naše účely vhodnější kvůli své jednodušší struktuře.

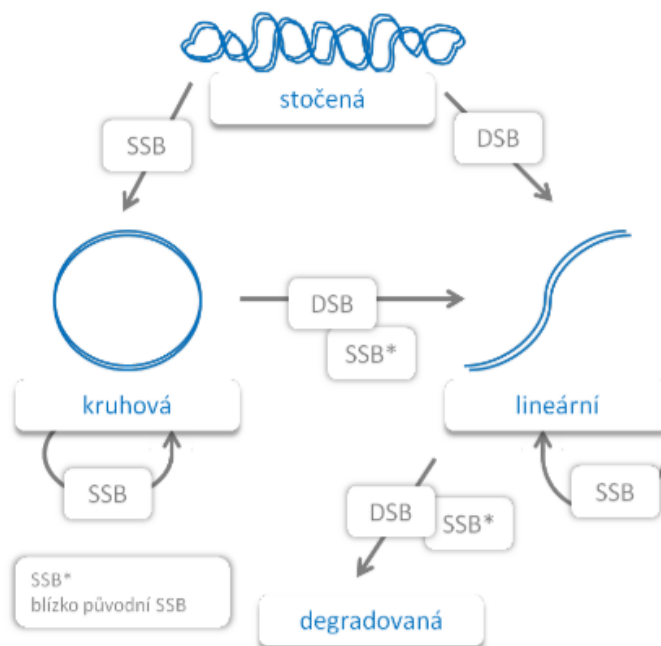
DNA je životně důležitá molekula, protože buňkám zadává jejich program a tak předurčuje vývoj i vlastnosti daného organismu. Z toho vyplývá, že když se poškodí DNA, může to mít vážné následky pro konkrétní buňky i celý organismus.

Působením záření může docházet k přímému poškození DNA a na druhou stranu vznikají v buňce ionty, radikály a excitované atomy, které také mohou DNA poškozovat (nepřímé poškození). Vzniklé ionty, radikály a excitované atomy působí na sebe navzájem nebo na jiné molekuly. Tím roste pravděpodobnost poškození struktury buňky i celého organismu.



Obrázek 1: Znázornění DNA

Největší škody způsobuje radikál OH<sup>-</sup> (je velmi reaktivní, takže téměř okamžitě reaguje s molekulami ve svém okolí a zbavuje je atomů vodíku). DNA se při ozáření poškodí takovým způsobem, že vznikají zlomy na řetězcích dvoušroubovic. Zlom je buď jednoduchý (SSB) nebo dvojný (DSB). Pokud vznikne na dvoušroubovici zlom v jednom místě, pak vzniká kruhová neboli relaxovaná forma plasmidové DNA. Pokud se dvoušroubovice zlomí ve dvou bodech, tak vzniká forma lineární. Celá situace je schematicky znázorněna na obrázku 2.



Obrázek 2: Konformace plasmidové DNA

## 2 Postup

Naším úkolem bylo zjistit rozdíly v radiačním poškození suchých a tekutých vzorků DNA. Připravili jsme roztok DNA o 100 $\mu$ l, tak abychom měli 150 ng na vzorek.

První sadu vzorků jsme nakapali na Petriho misku a nechali uschnout. Tím jsme si vytvořili suché vzorky. Ozářili jsme je  $^{60}\text{Co}$ . Všechny vzorky byly vystaveny záření po stejnou dobu, ale v různých vzdálenostech od zdroje. Získali jsme tak jiné dávky ozáření (0, 50, 100, 250 a 500 Gy).

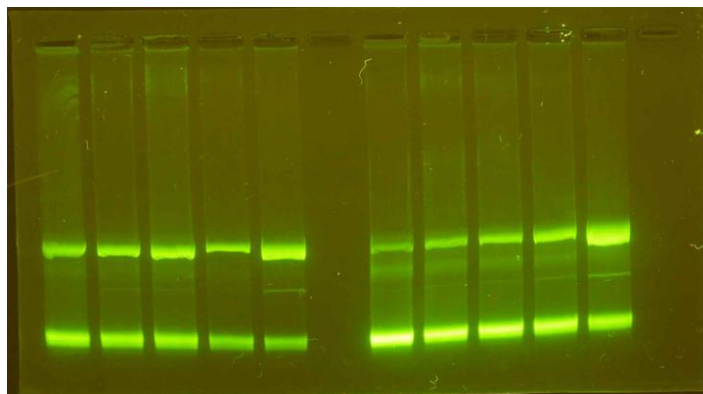
Tekuté vzorky jsme vystavovali záření samostatně a dávky (0, 5, 10, 25, 50 Gy) jsme měnili různou dobou záření. Do již ozářených vzorků jsme přidali barvivo a zředili jsme je destilovanou vodou. Všechny jsme zamíchali a centrifugovali.

Dalším krokem našeho postupu bylo připravit agarózový gel s malými jamkami. Jelikož je DNA záporně nabitá, bylo možné použít metodu agarózové elektroforézy pro oddělení různých konformací plasmidové DNA. Její princip spočívá v rozdílné pohyblivosti nabitých molekul v elektrickém poli.

Do každé jamky jsme po ztuhnutí gelu napipetovali jeden vzorek a zahájili elektroforézu. Elektroforéza probíhala hodinu při napětí 100 V. Ke zviditelnění výsledku na gelu jsme použili UV lampu. Gel jsme si vyfotili a k analýze jsme použili program Luthien.

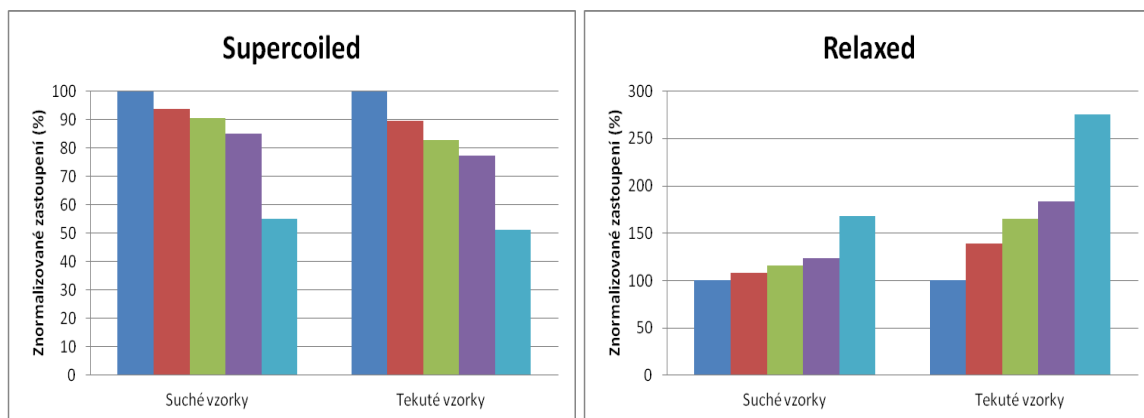
## 3 Výsledky

Pomocí programu Luthien jsme získali data, která jsme použili pro sestavení grafů. Ve spodních částech obrázku 3 můžeme vidět supercoiled formy, výše je zastoupení lineární formy a v nejvyšší vrstvě je vidět zastoupení formy relaxované.



Obrázek 3: Vyfocený gel s výsledky

Z grafu vpravo na obrázku 4 lze vyčíst, že zastoupení kruhové (relaxed) formy, tedy poškozené DNA je vyšší u tekutých vzorků, přestože jsme suché vzorky ozářili o řád vyššími dávkami. Naopak v grafu vlevo je znázorněn pokles supercoiled formy plasmidu, který je podle očekávání výraznější u tekutých vzorků. Důvodem většího poškození DNA u tekutých vzorků je přítomnost vody a tedy i vodních radikálů (např. OH $\cdot$ ).



Obrázek 4: Grafy

### 3 Závěr

Po ozáření vzorků tekutých a suchých a jejich následné analýze metodou gelové agarózové elektroforézy jsme dospěli k očekávanému výsledku, že poškození DNA v tekutých vzorcích je vyšší, než v těch suchých.

### Poděkování

Závěrem bychom rádi poděkovali především naší supervizořce Ing. Anně Michaelidesové za odborný dohled, přínosné rady, vysvětlení a trpělivost. Dále děkujeme celému oddělení dozimetrie záření, Ústav jaderné fyziky, AV ČR za poskytnutí prostorů, pomůcek a materiálů nezbytných k uskutečnění našeho miniprojektu. V neposlední řadě jsme vděční organizátorům TV@J za poskytnutí možnosti se této skvělé akce zúčastnit.

### 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.