

Jak chránit DNA před zářením

Lucie Dudková¹, Markéta Nečasová², Hana Pařízková³

¹Gymnázium Příbram, Legionářů 402, 261 01 Příbram

²Gymnázium Slovanské náměstí 7, 612 00 Brno

³Gymnázium Velké Meziříčí, Sokolovská 27, 594 01 Velké Meziříčí

¹lucie.dudkova@gmail.com, ²marketa.student@gmail.com,

³hana.parizkova@email.cz

Abstrakt:

Cílem této práce bylo zjistit, zda jsou glycyglycin a ethanol schopny chránit DNA před ionizujícím zářením. DNA byla ozářena v přítomnosti těchto sloučenin a analyzována pomocí agarózové elektroforézy. Radioprotektivní účinky byly prokázány pouze u ethanolu.

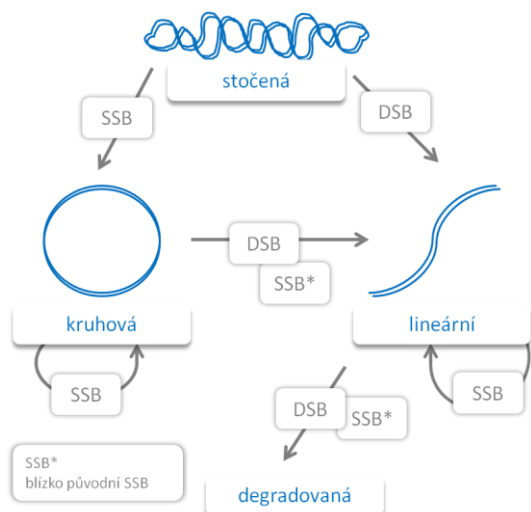
1 Úvod

Při ozáření buňky ionizujícím zářením (IZ) dochází k poškození všech jejích částí. Z hlediska dopadů záření na organismus je zásadním terčem zejména DNA, jejíž poškození může mít fatální následky pro konkrétní buňku i pro celý organismus. Energie IZ absorbovaná buňkou způsobí excitace a ionizace atomů a molekul podél stopy částice. Vytvořené ionty, radikály a excitované atomy mohou poškozovat různé struktury buňky, což může vést ke změnám v celém organismu. Pokud je energie absorbovaná přímo v místě cílové molekuly, mluvíme o poškození přímém, pokud k poškození dochází přes produkty radikálových reakcí vody, jedná se o poškození nepřímé. Vzhledem k malé pravděpodobnosti přímého zásahu biomolekul má nepřímé poškození větší význam [1].

Cílem našeho experimentu bylo potvrdit, že některé látky (tzv. scavengery) mohou škodlivé účinky volných radikálů redukovat. K tomu jsme použily metodu agarózové elektroforézy a zkoumaly jsme účinky dvou různých scavengerů: glycyglycinu a ethanolu.

2 Materiály a metody

V experimentu jsme pracovaly s plasmidovou DNA (plasmid pBR322), což je menší kruhová molekula DNA vyskytující se především v cytosolu některých bakterií, která se samostatně replikuje a nese doplňkové informace. Velikost plasmidů se pohybuje mezi 1 000 a 200 000 bází. Normální formou plasmidové DNA je forma stočená (viz Obr. 1). Vlivem IZ v ní může dojít ke zlomům, které její strukturu změní. Pokud dojde k jednomu zlomu na jednom vlákně dvoušroubovice DNA, vzniká forma relaxovaná (kruhová); při zlomu obou vláken se molekula rozvolní do formy lineární. Po mnohonásobném poškození se lineární forma degraduje.

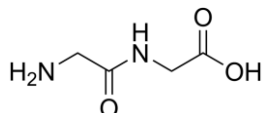


Obrázek 1 Zlomová poškození DNA

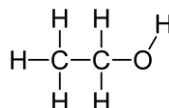
SSB = single strand-break (jednoduchý zlom)

DSB = double strand-break (dvojný zlom)

Jako scavengery jsme použily dvě látky – glycyglycin a ethanol. Glycyglycin (viz obr. 2) je jedním z nejjednodušších peptidů; je tvořen dvěma molekulami glycinu. Ethanol (viz obr. 3) se řadí mezi alkoholy. My jsme k pokusu použily ethanol ve formě 50% slivovice.



Obrázek 2 Chemická struktura glycyglycinu [2]



Obrázek 3 Chemická struktura ethanolu [3]

Elektroforéza je separační metoda, jejíž princip spočívá v rozdílné pohyblivosti nabitých molekul o různé velikosti a tvaru v elektrickém poli. Využívá se při ní gelové nosné médium, které pohyb molekul zpomaluje a umožňuje tak výsledek experimentu lépe sledovat. V praxi se používají různé typy gelu [4], my jsme využily gel agarózový.

3 Laboratorní postup

Příprava vzorků

Na spektrofotometru jsme nejprve změřily absorbanci rozpuštěné plasmidové DNA. Změřená hodnota absorbance na vlnové délce 260 nm byla 2,77, což odpovídá množství 138,5 ng DNA v jednom μl .

Připravily jsme si dvanáct vzorků, z nichž vždy dva měly stejné složení – z této dvojice jsme jeden vzorek ozařovaly, druhý byl kontrolní. Všechny vzorky obsahovaly přibližně 100 ng DNA, což odpovídalo objemu 0,8 μl . K šesti vzorkům jsme dále přidaly glycyglycin o třech různých koncentracích – 0,1 mM, 1 mM a 10 mM, ke čtyřem jsme přidaly 1 nebo 5 μl ethanolu. Všechny vzorky jsme doplnily destilovanou vodou na objem 10 μl (viz Tabulka 1).

Tabulka 1 Složení vzorků

Oz. – ozářený vzorek, neoz. – neozářený vzorek, glygly0,1(1, 10) – glycylglycin o koncentraci 0,1 (1, 10) mM

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
oz./neoz.	neoz.	oz.	neoz.	neoz.	neoz.	oz.	oz.	oz.	neoz.	neoz.	oz.	oz.
DNA (μl)	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
Aditivum (μl)	-	-	3,2 glygly0,1	3,2 glygly1	3,2 glygly10	3,2 glygly0,1	3,2 glygly1	3,2 glygly10	1 ethanol	5 ethanol	1 ethanol	5 ethanol
Voda (μl)	9,2	9,2	6	6	6	6	6	6	8,2	4,2	8,2	4,2

Příprava gelu

Jako nosné médium pro elektroforézu jsme použily 1% agar, který jsme připravily z 0,4 g sušeného agaru a 40 ml pufru 0,5x TAE (20 mM Tris, 10mM octan sodný, 1mM EDTA, pH = 8). Roztok jsme povařily a přidaly jsme do něj fluorescenční barvivo SYBR Green I. Poté jsme roztok vlily do formy, přikryly alobalem, abychom zamezily přístupu světla, a nechaly ztuhnout.

Ozařování vzorků

Vzorky jsme ozařovaly na zdroji ^{60}Co s poločasem rozpadu 1 925,5 dne ve vzdálenosti 0,278 m za pokojové teploty dávkou 5 Gy. Pro výpočet potřebné doby ozáření (29 min 8 s)

j jsme použily vzorec $t_0 = \frac{D}{D_0 e^{-\frac{\ln 2}{T_{1/2}} \cdot t}}$.

Elektroforéza

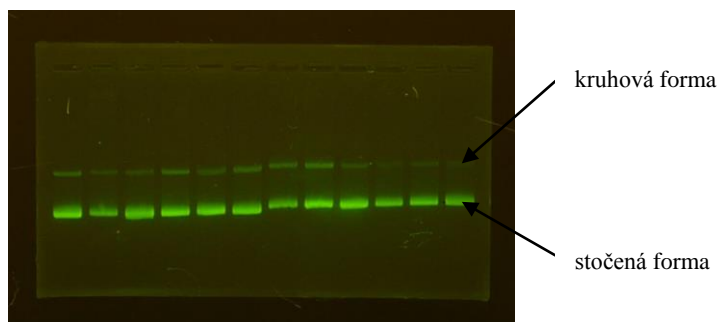
Ztuhlý gel jsme přesunuly do horizontální lázně s 0,5x TAE pufrém. Do každého vzorku jsme přidaly 2 μl nanášecího barviva a vzorky co nejrychleji nanášely do jamek v gelu. Elektroforézu jsme připojily ke zdroji stejnosměrného elektrického proudu o napětí 100 V a nechaly hodinu migrovat. Poté jsme gel vytáhly z lázně, umístily na UV-transiluminační stolek a vyfotily digitálním fotoaparátem.

Vyhodnocení výsledků

Fotografii výsledku elektroforézy jsme převedly do černobílého formátu a vyhodnotily pomocí programu Luthien, který umožňuje spočítání plochy píků na gelu. Z těchto hodnot jsme poté určily výtěžky jednoduchých zlomů DNA v jednotlivých vzorcích.

4 Výsledky

Pod UV byly na gelu u každého vzorku viditelné dva píky (viz Obr. 4): spodní představoval nepoškozenou (stočenou) formu DNA, horní formu relaxovanou. Lineární forma nebyla na gelu přítomná, protože použitá ozařovací dávka nebyla dostatečně vysoká.



Obrázek 4 Výsledný gel

Zastoupení jednotlivých forem DNA ve vzorcích je uvedeno v Tabulce 2.

Tabulka 2 Výsledky experimentu

Složení vzorku	Neozářený vzorek		Ozářený vzorek	
	Stočená forma (% DNA)	Jednoduché zlomy (počet/plasmid)	Stočená forma (% DNA)	Jednoduché zlomy (počet/plasmid)
DNA	89.23	0.114	91.4	0.090
DNA + glygly (0,1 mM)	95.12	0.050	82.93	0.187
DNA + glygly (1 mM)	86.7	0.143	74.1	0.300
DNA + glygly (10 mM)	92.77	0.075	80.65	0.215
DNA + 1 μ l ethanolu	93.12	0.071	94.06	0.061
DNA + 5 μ l ethanolu	95.01	0.051	93.74	0.065

5 Diskuse a závěr

O obou použitých látkách (glycylglycinu i ethanolu) jsme předpokládaly, že chrání DNA před IZ. Námi naměřená data to ale prokázala jen u ethanolu, u kterého byly výtěžky jednoduchých zlomů shodné u ozářených i neozářených vzorků. U glycylglycinu se nám ochranné účinky potvrdit nepovedlo. Pravděpodobně to bylo způsobeno nevhodně zvolenou (příliš nízkou) koncentrací použitého glycylglycinu, nižší použitou dávkou záření a také možnými nepřesnostmi při přípravě vzorků. Pro potvrzení nebo vyvrácení hypotézy, že glycylglycin je účinnou radioprotektivní sloučeninou by bylo třeba provést další experimenty.

Poděkování

Děkujeme paní Ing. Marii Davidkové za pomoc při provádění experimentu, za její čas a cenné připomínky.

Reference:

- [1] VON SONNTAG, C.: *Free-radical-induced DNA damage and its repair, a chemical perspective*, Springer, Heidelberg 2006.
- [2] <http://en.wikipedia.org/wiki/glycylglycine> (18. 6. 2013)
- [3] <http://en.wikipedia.org/wiki/ethanol> (18. 6. 2013)
- [4] GARFIN, D. E.: *Electrophoretic methods*, Academic Press, 2000.