

Mumie versus Zombie: na koho si vsadit v případě jaderné katastrofy

Čeněk Malík*

Tereza Baštová**

Marie Dohnalová***

Gymnázium Litoměřická, Litoměřická 726, Praha 9*

Gymnázium Česká Lípa, Žitovská 2969, Česká Lípa**

EDUCAnet Praha, Rozstýlská 1, Praha 11***

cendamalik@seznam.cz*

terkabastova@gmail.com**

marie.dohnalova21@gmail.com***

20.6.2017

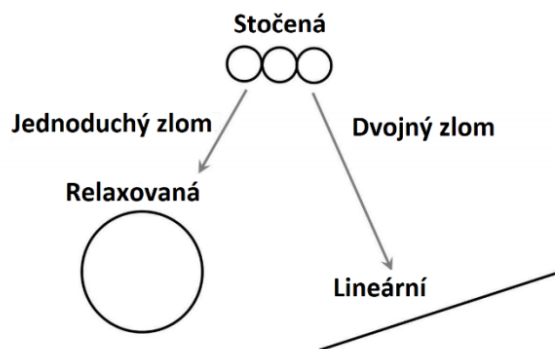
Abstrakt

Utrpěla by v případě jaderného ozáření větší poškození DNA mumie nebo zombie? Na tuto otázku jsme se zaměřili při práci na projektu. Naším cílem bylo porovnat poškození suchého vzorku DNA, mumie, a tekutého vzorku DNA, zombie. Tekuté vzorky jsme ozařovali kobaltovým zářičem a suché byly ozářeny v Japonsku na HIMAC o týden dříve. Pro detekci poškození DNA jsme použili gelovou elektroforézu. Na základě získaných dat jsme zjistili, že mumie by po ozáření měla méně poškozenou DNA.

1 Teoretický úvod

Ionizující záření může mít přímé a nepřímé účinky na organismus. Při přímém účinku jádro buňky absorbuje energii záření. Hlavním terčem v jádře buňky je DNA (deoxyribonukleová kyselina). DNA je molekula sloužící k přenosu genetické informace tvaru dvoušroubovice. Při absorpci energie může docházet k porušení chemických vazeb, rozpadu molekul a modifikování genetické informace. Nepřímé účinky zahrnují radiolýzu vody. Při radiolýze vody dochází ke vzniku hydroxidového aniontu a vodíkového aniontu. Dané radikály mohou poté narušovat vazby molekul. To způsobuje poškození biologických funkcí.

Pro prozkoumání přímého a nepřímého účinku záření na DNA je možné použít zjednodušené formy DNA, a to plasmidu. Jedná se o kruhovou molekulu DNA vyskytující se hlavně v cytoplasmě některých bakterií a která je schopná nezávislé replikace. Základní konformace je stočená, vlivem poškození může přecházet do jiných – nejprve do relaxované při jednoduchém zlomu na DNA a poté do lineární při dvojném zlomu, jak se zobrazeno na obrázku 1.



Obrázek 1: Konformace plasmidů

Mumie je konzervované tělo člověka, které neobsahuje vodu. V našem případě mumii reprezentoval vzorek suchého plasmidu DNA, který byl vysušený. Zombie je oživlý mrtvý člověk, který nebyl konzervován. Zombie jsme proto reprezentovali tekutým vzorkem plasmidu DNA.

Předpokládáme, že mumie bude mít méně poškozenou DNA, protože u suchého vzorku plasmidu můžeme očekávat pouze přímé účinky záření. U DNA zombí předpokládáme vliv přímého a nepřímého účinku záření kvůli přítomnosti vody. Uvědomme si také, že tělo zombie obsahuje 80% vody. Vzniklých radikálů proto bude velké množství, což způsobí, že vliv nepřímého účinku záření bude větší než přímého.

2 Materiály a metody

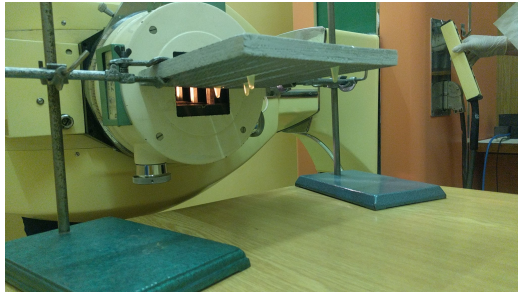
2.1 Použitá DNA a výroba vzorků

Pro naše měření jsme použili plasmid pBR322. Tento plasmid je produktem bakterie *Escherichia coli*, která je součástí střevní mikroflóry. Plasmid byl zředěn z jeho původní koncentrace $500 \text{ ng}/\mu\text{l}$ na koncentraci $75 \text{ ng}/\mu\text{l}$. Na přípravu jednoho vzorku se tedy použilo $2 \mu\text{l}$ zředěného plasmidu, tedy 150 ng , a dále $8 \mu\text{l}$ vody. Tekuté vzorky se napipetovaly do tubek a takto byly připraveny k ozáření. Suché vzorky se připravili tak, že se tekutá forma plasmidu nechala na sklíčku vysušit a ozáření probíhalo na sklíčku. Po ozáření byl vzorek opět zkapalněn.

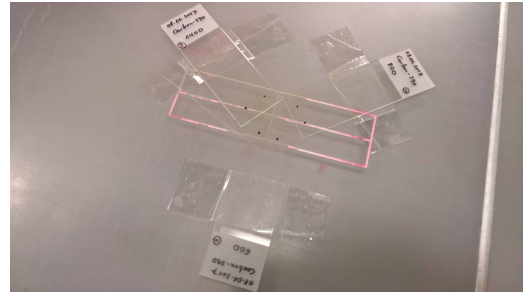
2.2 Ozařování

K ozařování tekutých vzorků jsme použili kobaltový zářič (^{60}Co – poločas rozpadu 5,29 roku) jako zdroj záření gama. Dávku ozáření vzorků jsme měnili pomocí upravením vzdáleností od zářiče. Rozsah použitých dávek byl 5 - 50 Gy.

Ozáření suchých vzorků proběhlo 10. 06. 2017 na HIMAC v Japonsku (jádra hélia s energií 150 MeV). Rozsah použitých dávek byl 200 - 1000 Gy. Ukázka průběhu ozařování je na obrázku 2.



(a) Ozařování tekutých vzorků na ^{60}Co

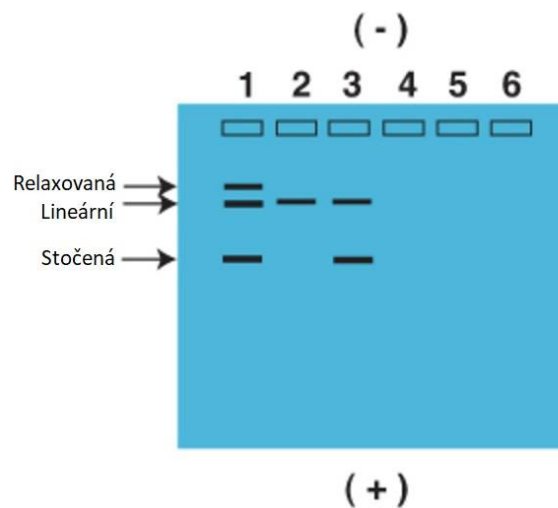


(b) Ozařování suchých vzorků na HIMAC

Obrázek 2: Ukázka průběhu ozařování

2.3 Agarózová elektroforéza

Gelová elektroforéza je metoda pro separaci a analýzu vzorků v závislosti na jejich velikosti, uspořádání a náboji (DNA je záporně nabitá molekula). Na obrázku 3 je vyobrazený příklad separace různých konformací plasmidové DNA.



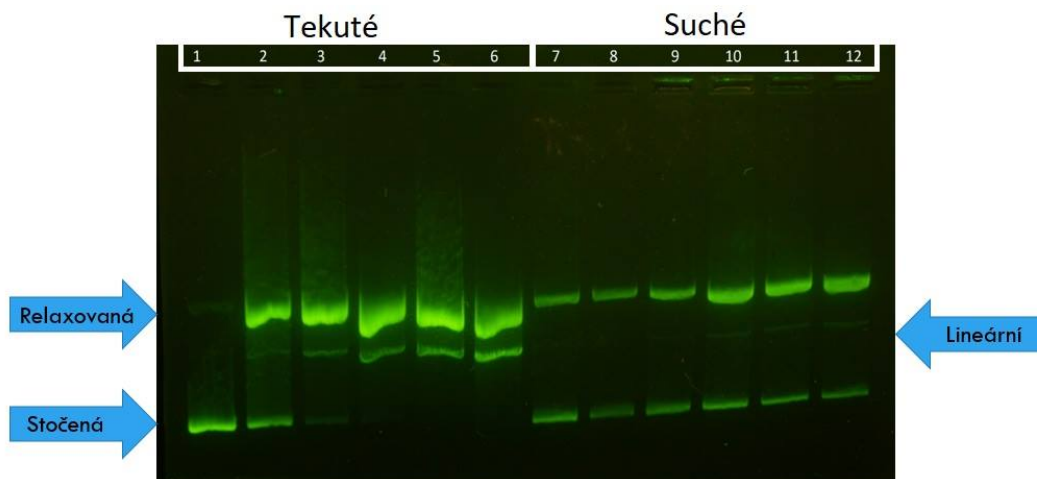
Obrázek 3: Ukázka separace různých konformací plasmidů

V našem případě jsme použili 1% agarózový gel, který sestával z 0,4 g Agarózy SERVA, 40 ml TAE 0,5x (solný pufr) a SYBR greenu (Thermo Fisher Scientific), což je UV citlivé barvivo. Gel jsme vařili v mikrovlnné troubě 2,5 minuty a poté přelili do speciální vaničky s hřebínkem a nechali ho hodinu chladnout.

Do drážek gelu jsme poté přidali ozářené vzorky po přidání do každého vzorku 2 μl Loading dye 6X (Thermo Fisher Scientific) pro jejich zhuštění a zviditelnění a následně jsme gel vystavili elektrickému poli 100V na 75 minut. Následně jsme DNA v gelu zobrazili pomocí UV lampy. Získaná data jsme vyhodnotili pomocí programu Luthien, který rozeznává intenzitu svítivosti.

3 Výsledky a diskuze

Na obrázku 4 je vyfocený gel vystavený UV světlu. Prvních šest sloupců reprezentuje tekuté vzorky (Zombie) a následných šest sloupců suché (Mumie).



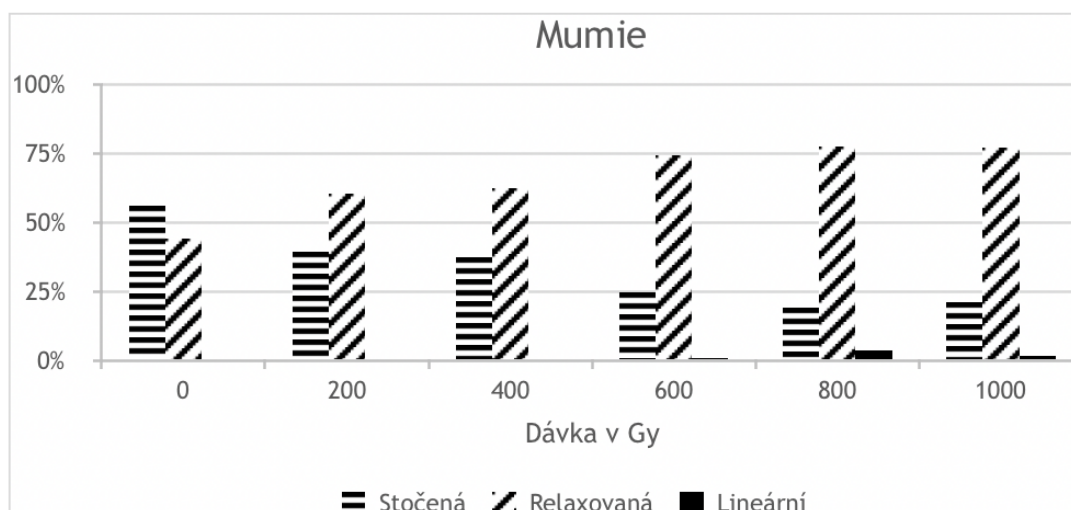
Obrázek 4: Výsledný gel pod UV lampou

Tekuté - rozdělení forem plasmidu						
Dávka/Gy	0	5	15	25	35	50
Stočená	98%	23%	3%	0%	0%	0%
Relaxovaná	2%	77%	94%	93%	88%	83%
Lineární	0%	0%	3%	7%	12%	17%

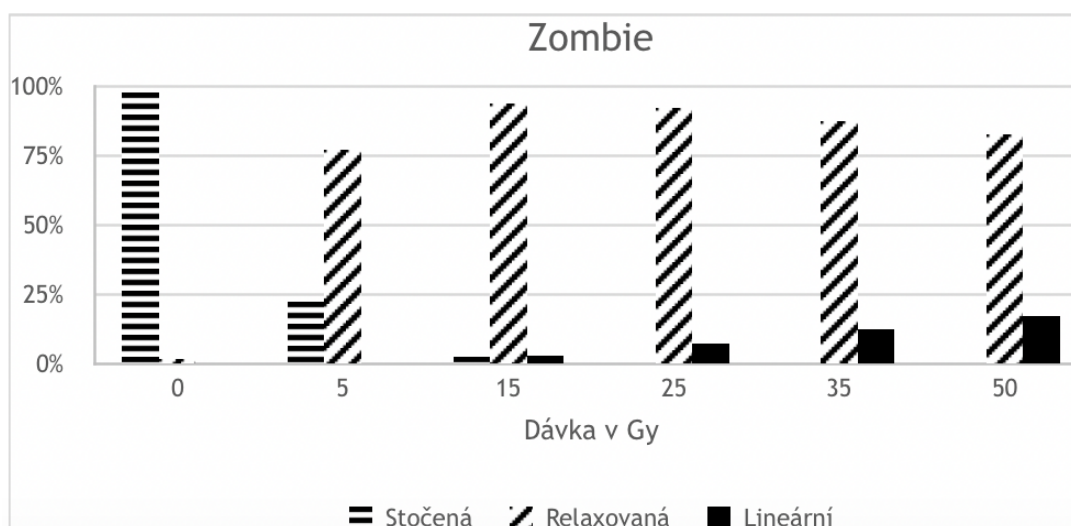
Suché - rozdělení forem plasmidu						
Dávka/Gy	0	200	400	600	800	1000
Stočená	56%	40%	37%	25%	19%	21%
Relaxovaná	44%	60%	62%	74%	77%	77%
Lineární	0%	0%	0%	1%	4%	2%

Obrázek 5: Tabulka závislostí jednotlivých konformací plasmidů v suchých a tekutých vzorkách na dávce ionizujícího záření

Na obrázcích 6 a 7 je vyhodnocen gel a různé konformace plasmidů.



Obrázek 6: Závislost jednotlivých konformací plasmidů v suchém vzorku na dávce ionizujícího záření



Obrázek 7: Závislost jednotlivých konformací plasmidů v tekutém vzorku na dávce ionizujícího záření

Z výsledků je patrné, že mumie by v případě jaderné katastrofy měla méně poškozenou DNA. U mumie i při větších dávkách ionizujícího záření dochází k menšímu poškození plasmidů DNA než u zombie při velkých dávkách ionizujícího záření.

4 Shrnutí

Z výsledků je patrné, že DNA zombie je více poškozena (i při relativně nízké dávce je většina plasmidů přeměněna na lineární konformaci) zatímco DNA mumie odolává i vysoké dávce radiace bez větší přeměny na lineární konformaci. Tento výsledek je způsoben nepřímým působením ionizujícího záření – vznik radikálů z vody, které svou reaktivitou dále poškozují DNA. Nepřímý účinek především ovlivňuje DNA zombie (velké množství vody), zatímco na DNA mumie působí převážně přímý účinek.

Poděkování

Děkujeme Ing. Anně Michaelidesové za nepostradatelnou pomoc a obsáhlou konzultaci, AV ČR za poskytnutí prostorů a FJFI za zorganizování Týdne Vědy.

Reference

- [1] R.K. Murray, *Harperova biochemie*, 2. vydání, 2002.
- [2] B. Alberts, D. Bray, A. Johnson, *Základy buněčné biologie*, 2. vydání, 1999.