

Poškození DNA účinkem ionizujícího záření

N. Stoklasová
Friedrich-Schiller-Gymnasium, Pirna
sNatalie.s@seznam.cz

M. Caha
Gymnázium Velké Meziříčí
nitramahac@seznam.cz

G. Krejčíková
Gymnázium Plasy
g.krejcikova@seznam.cz

M. Bulínová
Gymnázium Plasy
mery.bulinova@gmail.com

Oddělení dozimetrie záření
Ústav jaderné fyziky, AV ČR, v.v.i.
Na Truhlářce 39/64, Praha 8, 180 86

Abstrakt:

Naším úkolem bylo zkoumat poškození DNA účinkem ionizujícího záření. Výtěžek jednoduchých a dvojných zlomů v plasmidové DNA pro různé dávky gama záření byl změřen metodou agarózové elektroforézy.

1 Úvod

Makromolekula DNA, jakožto nositelka genetické informace, se řadí mezi nejdůležitější části buňky. Její poškození může vážně ohrozit celý organismus. V radiobiologickém výzkumu se často pracuje s extrachromozomální, autoreplikující se kruhovou DNA, tzv. plasmidem. Pro účely tohoto experimentu byla použita plasmidová DNA pcDNA3, obsahující 5446 bázových párů (dále jen bp), pBR s 5509 bp a pBS s 3204 bp. Ionizující záření poškozuje DNA dvěma způsoby. Přímým způsobem je interakce ionizující částice s atomem molekuly DNA, nepřímý probíhá prostřednictvím produktů radiolýzy vody. Vznikají tak jednoduché i dvojně zlomy řetězce, dochází k poškození bází, cross-linky uvnitř molekuly nebo mezi DNA a proteiny. Buňku tvoří z velké většiny voda, a proto v důsledku ozáření nejčastěji dochází k

radiolýze vody, jejímž produktem jsou hydroxylové radikály. Po ozáření mění plasmidová DNA svoji strukturu na kruhovou (v případě jednochého zlomu) nebo lineární (v případě dvojného zlomu), tyto struktury pak v gelu v elektrickém poli různě rychle migrují. Cílem projektu bylo určit výtěžky jednoduchých a dvojných zlomů plasmidové DNA v závislosti na rostoucí dávce ionizujícího záření.

2 Materiály a metody

- **Použité chemikálie:**

- autoklávaná (sterilizovaná) destilovaná voda
- plasmidy pcDNA3, pBR a pBS
- 100 mM fosfátový pufr (pH 7,9)
- agarosa
- 50x TAE pufr (pH 8)
- fluorescenční barvivo SYBR Green I
- nanášecí (loading) pufr

- **Příprava vzorků:**

Pro nepoškozenou (dvouvláknovou) DNA platí, že je-li spektrofotometrem změřená optická hustota rovna jedné, pak je koncentrace DNA rovna 50 mg/ml. Pro každý plasmid bylo připraveno celkem 8 vzorků, z toho 6 použitých a 2 záložní. Každý vzorek obsahoval 100ng DNA v 10 mM fosfátového pufru. Konečný objem každého vzorku měl být 10 μ l.

	pBS	pcDNA3	pBR
Plasmid [μ l]	7,7	20	20
Fosfátový pufr [μ l]	10	10	10
Voda [μ l]	82,3	70	70

- **Příprava gelu pro elektroforézu:**

1% agarosový gel v 0,5x TAE přikrytý alobalem byl za stálého míchání vařen dostatečně dlouhou dobu pro rozpuštění agarosy. Do této směsi schlazené na 60°C bylo přidáno barvivo SYBR Green I v poměru 1:10 000. Po zamezení přístupu světla mohl gel tuhnout v připravené formě.

- **Ozařování vzorků ^{60}Co :**

Vzorky byly ozářeny γ zářením za pokojové teploty ve vzdálenosti 0,293 m zdrojem ^{60}Co . Použité dávky byly 2, 4, 6, 8, 10 Gy. Ze vzorců $\frac{At}{A_0} = e^{-\lambda t}$ a

$$\lambda = \frac{\ln 2}{T_{1/2}} \text{ byl odvozen vzorec } t = \frac{Dl^2}{At}, \text{ pomocí něhož jsme vypočítali dobu}$$

ozařování pro dávku 2 Gy, která je rovna 5 minutám a 52 sekundám.

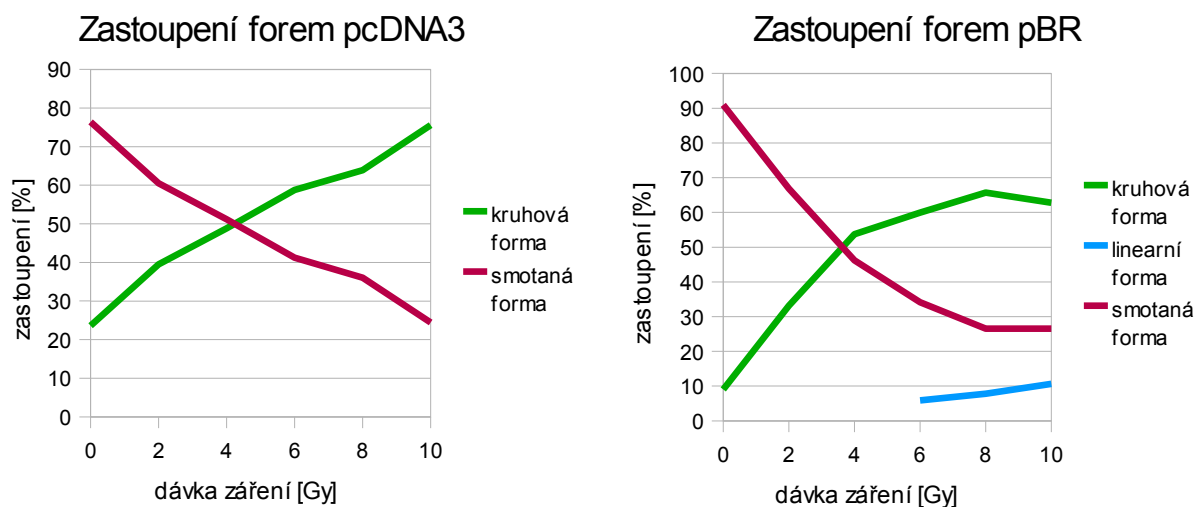
- **Elektroforéza:**

Ztuhlý gel byl umístěn do lázně 0,5x TAE pufru. Každý vzorek obohacený o 2 μ l nanášecího (loading) pufru byl velmi rychle nanesen do jamek v gelu. Elektrody zapojené ve správném směru migrace DNA na gelu byly nastaveny na napětí 100 V.

- **Zobrazení gelu:**

Po úspěšné migraci byl gel vyndán z lázně a následně vyfocen v temné komoře na UV světle.

3 Výsledky a diskuse



Z výše uvedených grafů je evidentní, že s přibývajícím dávkou ozáření stoupá zároveň pravděpodobnost poškození DNA. Smotaná forma je nepoškozená DNA, ozářením vznikají jednoduché zlomy a tím tzv. kruhová DNA. Při větších dávkách ozáření pak vznikají zlomy dvojné a s nimi lineární forma DNA. U obou výsledků je zřetelné, že při ozáření větší dávkou než 4 Gy již převažuje poškozená DNA nad nepoškozenou.

Zajímavým úkazem je, že pouze u druhého vzorku, a to až při hodnotě ozáření 6 Gy, se poprvé objevila lineární forma. Autoři předpokládají, že tento jev může být způsoben vychytávacími látkami přítomnými v pufru který, jak známo, váže volné radikály, které vznikají při radiolýze vody.

4 Poděkování

Autoři děkují především supervizorce Ing. Viktorii Madhusudhan Štísově, PhD. za vedení našeho projektu ke zdárnému konci a Ing. Kateřině Pachnerové Brabcové, PhD. za ozáření. Dále chtějí vyjádřit své díky Fakultě jaderné a fyzikálně inženýrské ČVUT, Oddělení dozimetrie záření Ústavu jaderné fyziky a v neposlední řadě týmu Týdne vědy.

Reference:

- [1] BRAY A., LEWIS J., WALTER R.R.: *Základy buněčné biologie*, 2. vydání, Espero Publishing, s.r.o., 1998
- [2] SAMBROOK J., RUSSELL D.W.: *Molecular Cloning*, 3. vydání, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001
- [3] HALL E.J., GIACCIA A.J., *Radiobiology for the Radiologist*, 6. vydání, Lippincott Williams and Wilkins, 2006