VLIV LÁTEK TESTOVANÝCH V AMESOVĚ TESTU NA TOPOLOGICKÝ STAV PLASMIDOVÉ DNA

Lucie Wozniaková
Katedra biologie a ekologie, Přírodovědecká fakulta, Ostravská univerzita v Ostravě, Chittussiho 10, 710 00 Ostrava, r10741@student.osu.cz

Abstrakt

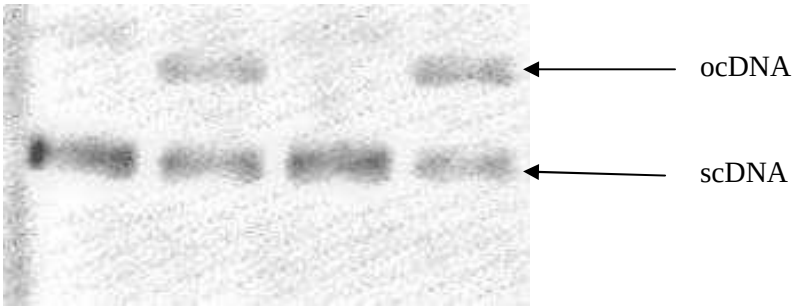
DNA je neustále napadaná reaktivními látkami, které mohou mít vážný vliv na její strukturu a funkci. Strukturní změny plynou především z úprav bází, ke kterým dochází primárně v důsledku jejich vystavení různým chemikáliím [1.].

V průběhu let bylo navrženo mnoho detekčních systému, které nejčastěji využívají baktérie. V testech se vyskytují tzv. standardy, pro které vykazují pro daný test pozitivní výsledek. V Amesově testu jsou těmito standardy azid sodný a nitrofurantoin. Tato práce se zaměřuje na genotoxické vlastnosti těchto látek pomocí molekulárně-biologických metod.

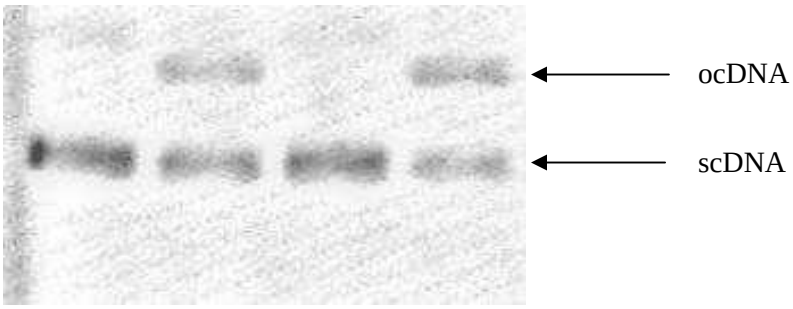
Amesův test je krátkodobý bakteriálně reverzně mutagenní test speciálně navržen pro detekci širokého spektra chemických látek, které mohou být zdrojem genetického poškození vedoucích ke genovým mutacím [2.]. V této práci bylo použito metody detekce pomocí reparačního enzymu Endonukleázy III. Endonukleáza III je protein, který pochází z baktérie *E.coli*. Enzym uvolňuje poškozené pyrimidinové báze s dvouřetězcové DNA a dále upravuje na 3´ a 5´ koncích AP místa a ponechává 3´ fosfáty a 5´ fosfáty. Báze, které je Endo III schopna rozpoznat patří například močovina; 5,6-dihydroxytymin; 5-hydroxy-5-metylhydatoin; uracil–glykol; metyltartronyl močovina [3.].

K detekci poškození plasmidové DNA byla použita elektroforéza na agarózovém gelu. Agarózový gel je vysoce porézní materiál polysacharidové povahy, který se chová v elektroforetickém poli jako síto, oddělující od sebe jednotlivé, různě dlouhé fragmenty nukleové kyseliny [4.]. Agarózové gely nemají takovou rozlišovací schopnost jako gely polyakrylamidové, zato mají větší rozmezí separace. Při použití stejnosměrného napětí můžeme v agarózových gelech účinně dělit fragmenty DNA v rozmezí 50 bp až 50 000 bp [5.].

Z obrázků 1 a 2 lze vyvodit, že Endo III nedetekuje poškození způsobena 10mM azidem sodným a nitrofurantoinem. Nelze však vyloučit, že dané látky DNA nepoškozují, ale poškození nejsou detekovatelná EndoIII. Poškození mohou být detekovatelná jinými reparačními enzymy, a proto by bylo vhodné pokus opakovat a provést i pomocí jiných reparačních enzymů, které detekuji jiné typy poškození.



Obrázek 1. Poškození bází pBS azidem sodným (10mM) detekováno reparačním enzymem. Start 1: kontrola DNA; start 2: DNA + Endo III; start 3: DNA + 10mM NaN_3; start 4: DNA + 10mM NaN_3 + Endo III.



Obrázek 2. Poškození bází pBS nitrofurantoinem (10mM) detekováno reparačním enzymem. Start 1: kontrola DNA; start 2: DNA + Endo III; start 3: DNA + 10mM; start 4: DNA + 10mM + Endo III.

Klíčová slova: *genotoxicita; poškození DNA; plasmidy; Amesův test; reparační enzymy*

Poděkování

Ráda bych poděkovala panu doc. RNDr. Petru Pečinkovi, Csc. za trpělivost a jeho cenné rady při vedení této práce. Moje poděkování patří také Mgr. Jiřímu Červeňovi za jeho pomoc a rady v laboratoři.

Literatura

[1.] Jena, N. R. *DNA damage by reactive species: Mechanism, mutations and repair.* Journal of Biosciences, 2012, roč. 37, s. 503-517.

[2.] Mortelmans, K.; Zeiger, E. *The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay.* Mutation Research, 2000, č. 445, s. 29-60.

[3.] New England BioLabs [online]. Endonuclease III (Nth). [cit. 31. března 2013]. Dostupné na Internetu: https://www.neb.com/products/m0268-endonuclease-iii-nth.

[4.] Mazura, I. et al. *Speciální metody molekulární biologie*. Praha, Nakladatelství Karolinum 2001. ISBN 80-246-0258-X.

[5.]. Pečina, P. *Laboratorní cvičení z molekulární biologie.* Ostravská univerzita v Ostravě, 2007. ISBN 978-80-7368-414-3.