# PRŮMYSLOVÁ BARVIVA A JEJICH INTERAKCE S DNA

**Lucie Kortišová[1]**
[1]*Ostravská univerzita v Ostravě, PřF OU, Katedra biologie a ekologie, Chittussiho 10, 710 00 Slezská Ostrava, +420725439480, kortisova.lucie@gmail.com*

## Abstrakt

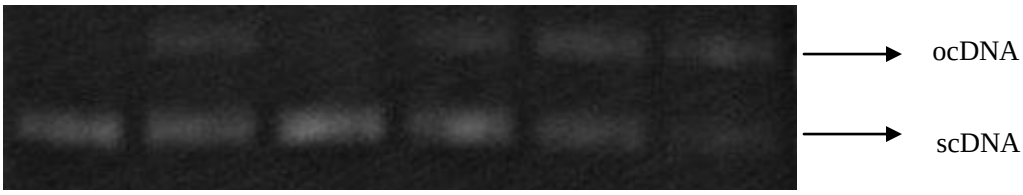
Buňky všech živých organismů jsou neustále vystavovány nejrůznějším škodlivým vlivům ať už endogenního či exogenního původu, které je dokáží poškozovat. Pro všechny organismy je obzvlášť důležité chránit si svou DNA, jakožto nositelku genetické informace. I nepatrná modifikace této molekuly může způsobit velký problém. Organismy si naštěstí v průběhu evoluce dokázaly vyvinout několik specifických reparačních drah, které umí poškozenou DNA opravit.

Mezi exogenní látky, se kterými může DNA díky rozvinutému průmyslu současné doby interagovat, patří průmyslová barviva. O škodlivých vlivech azobarviv bylo v minulosti pojednáváno mnohokrát, ovšem existují i jiné druhy průmyslových barviv, které mají na DNA neblahý vliv. V této práci byl testován vliv azobarviva Methyl Red a trifenylmetanového barviva Malachite Green na plasmidovou DNA.

Existují nejrůznější testy genotoxicity, jako je např. Amesův test. Tyto metody detekují látky, které mohou být zdrojem genetického poškození vedoucích ke genovým mutacím [1]. Nedokáží však určit konkrétní poškození na molekule DNA, které k mutaci vedlo. Tato zjištění by mohla být přínosem pro další studia genotoxicity. K tomuto účelu slouží molekulárně-biologické metody detekce poškození. V této práci bylo použito metody detekce pomocí reparačních enzymů, konkrétně Endonukleázy III. Je to enzym, který uvolňuje poškozené pyrimidinové báze z dvouvláknové DNA za vzniku abazických míst. Endo III pak v místě opravy báze rozštípne abazické místo a otevře kruh cukerné složky (způsobí zlom v řetězci). Endo III umí takto rozpoznat např. močovinu, 5,6-dihydroxytymin, tymin glykol, 5-hydroxy-5-metylhydantoin, uracil glykol, 6-hydroxy-5,6-dihdrotymin a metyltartronylmočovinu [2].

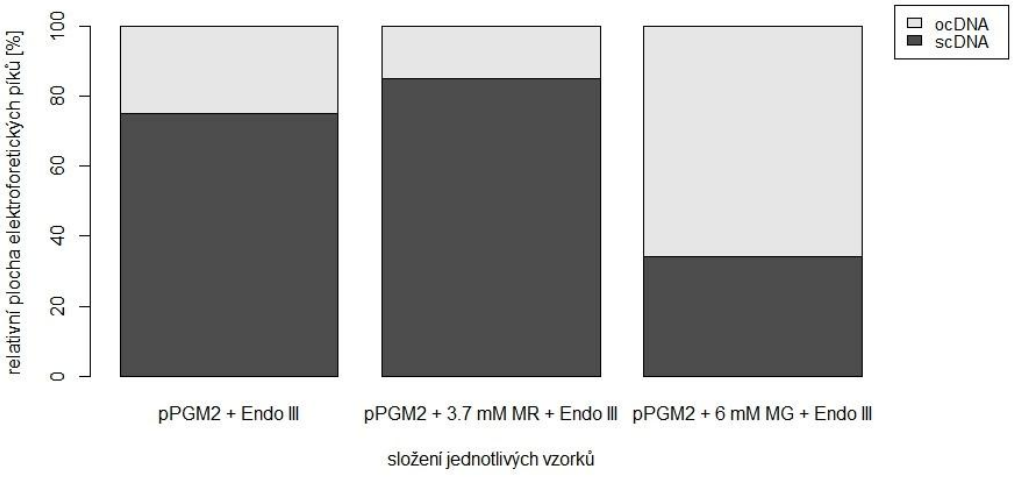
Změny plasmidové DNA byly v této práci detekovány pomocí elektroforézy na agarózovém gelu. Gelová elektroforéza se používá jednak pro separaci různě dlouhých molekul, ale i pro odlišení molekul DNA o stejné velikosti, stejném složení, avšak lišících se topologickým stavem. Na gelu se nejpomaleji pohybuje relaxovaná forma DNA, popřípadě otevřená kružnicová DNA (ocDNA). Superhelikální DNA (scDNA) se vyznačuje velkou kompaktností (molekula DNA zaujímá při stejné hmotnosti menší objem oproti ocDNA), proto migruje gelem rychleji [3]. Na základě výše uvedených poznatků můžeme gelovou elektroforézu použít i pro detekci poškození DNA, kdy např. přerušení jejího řetězce či přechod do odlišné topologické struktury vlivem poškození vede ke změně její elektroforetické mobility.

Při testování byla nejprve vytvořena koncentrační řada zkoumaných látek a byla otestována jejich přímá reakce s plasmidovou DNA (pPGM2). Na základě výsledků byla barviva Methyl Red a Malachite Green o vybraných koncentracích testována i pomocí Endo III. Jak už bylo řečeno, změny plasmidové DNA byly detekovány pomocí elektroforézy na agarózovém gelu.




**Obrázek 1.** Detekce genotoxicity 3.7 mM Methyl Red a 6 mM Malachite Green pomocí reparačního enzymu Endo III. Dráha: 1) pPGM2, 2) pPGM2 + Endo III, 3) pPGM2 + 3.7 mM Methyl Red, 4) pPGM2 + 3.7 mM Methyl Red + Endo III, 5) pPGM2 + 6 mM Malachite Green, 6) pPGM2 + 6 mM Malachite Green + Endo III.

Rozdíly intenzit elektroforetických signálů daných fragmentů byly podrobeny analýze pomocí programu Image J a zaneseny do následujícího grafu.




**Obrázek 2**. Srovnání elektroforetických signálů nemodifikované DNA (pPGM2) a DNA modifikované MR a MG reagující s enzymem Endo III.

Z předchozího obrázku a grafu lze vyvodit, že Endo III poškození účinkem 3.7 mM Methyl Red nedetekuje. Při reakci DNA s 6 mM Malachite Green však enzym Endo III poškození detekuje. Můžeme tedy usoudit, že MG o koncentraci 6 mM poškozuje DNA na úrovni bází, konkrétně pyrimidinů (jejich příklady byly vyjmenovány výše). Nemůžeme však zamítnout, že Methyl Red DNA také nepoškozuje. Tato poškození nejsou detekovatelná enzymem Endo III, jinými reparačními enzymy však být rozpoznána mohou. Pro průkazný závěr by bylo vhodné experiment opakovat a provést jej i pomocí jiných reparačních enzymů, detekující odlišná poškození bází.

***Klíčová slova:*** *Poškození DNA; detekce DNA; Methyl Red; Malachite Green.*

**Poděkování**

Velice ráda bych poděkovala panu doc. RNDr. Petrovi Pečinkovi, CSc. za jeho trpělivost a cenné připomínky při vedení této práce. Můj dík patří také Mgr. Jiřímu Červeňovi za jeho rady a neocenitelnou pomoc v laboratoři.

**Literatura**

[1.] MORTELMANS, K., ZEIGER, E. *The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay*. Mutation Research, 2000, č. 455, s. 29-60.

[2.] DIZDAROGLU, M. *Substrate specificities and excision kinetics of DNA glycosylases involved in base-excision repair of oxidative DNA damage.* Mutation Research, 2003, č. 531, s. 109-126.

[3.] BOHÁČOVÁ, P. *Vliv genotoxických a mutagenních látek na topologický stav plasmidové DNA*. Diplomová práce; Ostravská univerzita v Ostravě, 2011, 77s.