

STUDIUM APOPTOTICKÝCH ZMĚN VE STRUKTUŘE DNA POMOCÍ GELOVÉ ELEKTROFORÉZY

Veronika Podzimková, Jiří Červeň, Petr Pečinka

*Katedra biologie a ekologie, Přírodovědecká fakulta, Ostravská univerzita v Ostravě,
Chittussiho 10, 710 00 Ostrava, p10188@student.osu.cz*

Abstrakt

Apoptóza je jednou z nejstudovanějších vlastností buněk [1]. Tento řízený proces umožňuje v organismu udržovat homeostázu a jeho funkčnost. Poruchy buněčné apoptózy vedou k řadě onemocnění. Rozvoj detekčních metod se v poslední době zaměřil hlavně na oblast detekce fragmentované DNA. Do skupiny kvalitativních metod patří také gelová elektroforéza. Cílem práce bylo optimalizovat podmínky pro použití gelové polyakrylamidové elektroforézy pro detekci fragmentů plazmidové DNA. Byl použit plazmid pBS a odvozená forma pPGM2. Pro přípravu vhodných fragmentů DNA byly použity restriční endonukleázy *SacI* a *PvuII*. Základní délka vzniklých fragmentů byla 220, 228 u pBS a 220 a 254 bp u pPGM2. Tyto úseky DNA byly prodlouženy pomocí terminální deoxyribonukleotidyl transferázy. Rozdělení fragmentů pomocí polyakrylamidové elektroforézy ukázalo, že vhodným substrátem pro TdT je dATP a metodu bude možné použít jako srovnávací k elektrochemickým metodám detekce.

Klíčová slova: *apoptóza; detekce; elektroforéza; plazmid*

Úvod

Apoptóza je nejstudovanější formou programované buněčné smrti. Pomocí apoptózy se v organismu udržuje homeostáza, zabráňuje se fungování a dělení poškozených buněk, nebo se z organismu odstraňují přebytečné buňky. Pokud dojde k poruchám kontroly buněčného cyklu, vyskytují se problémy s nadměrným nebo naopak nedostatečným odstraňováním buněk z tkání. Špatná regulace buněčného cyklu vede k řadě zdravotních problémů [1]. V dnešní době je studium apoptózy významné hlavně z hlediska studia léčby nádorových onemocnění.

Metody, které se k detekci apoptózy využívají, jsou založeny na kvalitativním stanovení. Dávají informaci, zda apoptóza v buňce probíhá, nebo neprobíhá. Fragmentace DNA je hlavním znakem, na který se současné metody zaměřují. Mezi kvalitativní metody patří gelová elektroforéza, separační technika založená na pohybu nabitých molekul v elektrickém poli. DNA je díky fosfátovým skupinám záporně nabitou molekulou. V elektrickém poli závisí rychlost jejího pohybu na velikosti a konformaci molekuly [2]. Elektroforéza poskytuje kvalitativní odpověď a pro buňky v apoptóze je vysoce specifická. Je založena na rozdělení a následné detekci jaderné DNA po působení endonukleáz, které při apoptóze štěpí DNA na fragmenty o velikosti 180-200 bp. [3].

Cílem práce bylo ukázat, za jakých podmínek bude možné použít gelovou elektroforézu jako srovnávací metodu. Závěry vyplývající z pokusů by měly být využity při optimalizaci detekce apoptózy elektrochemickými metodami.

Materiál a metody

Pro detekční účely byl použit plazmid pBS (p-Blueskript II SK(-), 2961 bp) a od něj odvozený pPGM2 (2987 bp).

Plazmidová DNA byla izolována z buněk bakteriálního kmene *Escherichia coli* TOP10 pomocí izolačních kolonek QUIAGEN.

Plazmidová DNA byla dále štěpena pomocí restriční endonukleázy *SacI* (8U/μl, Takara), v množství 8 U enzymu na 1 μg DNA, inkubace probíhala přes noc při 37°C. Specifické restriční místo pro plazmidy odvozené od typu pBS je v místě 755 bp. Z kruhové plazmidové DNA vznikla lineární DNA s 3'-OH přesahujícími konci.

Vzorky byly sráženy 1/3 objemu 3M octanu sodného a 96% etanolem vychlazeným na -20°C. Následně byla DNA centrifugována (15000 x g, 30 minut, 4°C), pelet rozpuštěn v 70% etanolu (-20°C) a opět centrifugován (15000 x g, 15 minut, 4°C).

Pro prodloužení volných konců DNA byly vybrány nukleotidy adeninu a tyminu (dNTP 100 mM, Fermentas). K volným koncům DNA byly přidány ve dvou poměrech: 1 pmol volných konců ku 1 μM roztoku dNTP a 1 pmol (volných konců) ku 5 μM dNTP. Vzorky byly s terminální deoxynukleotidyltransferázou (20U/μl, New England Biolabs) inkubovány po dobu 2 hodin při 37°C.

Po inkubaci byly vzorky znovu přesráženy a poté štěpeny restriční endonukleázou *PvuII* (15 U/μl, 37°C, přes noc; Takara). V plazmidu pBS má enzym 2 specifická restriční místa: 527 a 975 bp a odštěpuje z jednoho konce lineární molekuly fragment o velikosti 220 bp a z druhého konce fragment o velikosti 228 bp. Obdobně je to u plazmidů pPGM, kdy vznikají fragmenty o délce 220 a 254 bp.

Vzniklé fragmenty byly detekovány pomocí gelové elektroforézy. Vzorky byly smíchány s nanášecím pufrém (0,25% bromfenol blue; 0,25% xylencyanol FF; 40% sacharóza ve vodě) a nanášeny na gel. Polyakrylamidový gel byl připraven o koncentraci 5 % (akrylamid-N-N'-metylenbisakrylamid; persíran amonný; TEMED; 10x TBE). Elektroforéza probíhala vertikálně 5,5 hodiny při intenzitě elektrického pole 10 V/cm. K detekci fragmentů byl využit roztok interkalačního činidla ethidiumbromidu (1 μl/ml), který fluoreskuje při ozáření UV světlem.

Výsledky a diskuze

Výsledek rozdělení fragmentů DNA je vidět na obrázcích 1 a 2.

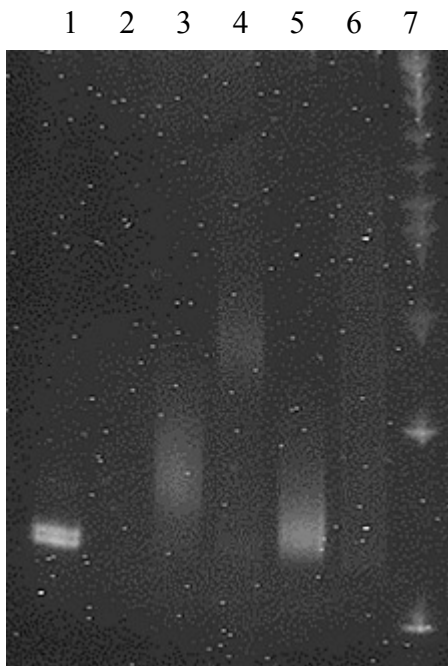
V pozitivní kontrole u pBS je možné rozlišit na gelu elektroforetické proužky odpovídající velikostem 220 a 228 bp.

Fragmenty DNA prodloužené pomocí TdT, které bylo možné vyhodnotit, jsou uvedené v tabulce 1. Prodloužené úseky jsou jednořetězcové. Konkrétní hodnoty se vztahují k obrázkům 1 a 2 a jsou udávány podle známé délky fragmentů 100 bp standardu. U dTTP ve vyšším poměru k volným koncům DNA nebylo možné stanovit oblast většího výskytu fragmentů DNA.

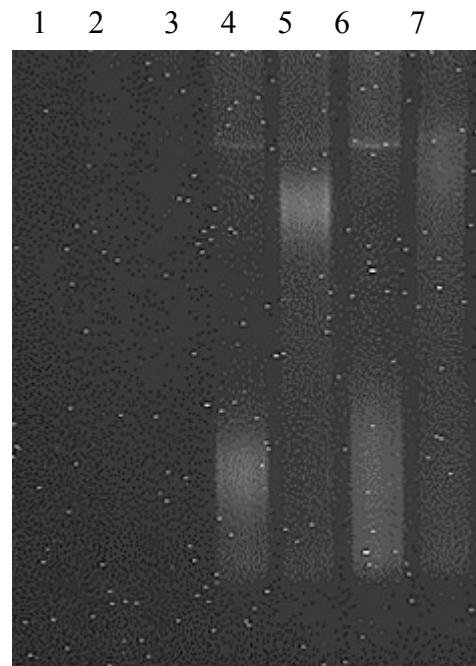
Tabulka 1. Oblasti detekované prodloužené DNA

Přidaný nukleotid	dATP (nižší poměr)	dTTP (nižší poměr)	dATP (vyšší poměr)
Délka fragmentů u pBS [bp]	250-300	220-300	350-400
Nejintenzivnější signál u pBS [bp]	270	240	380
Délka fragmentů u pPGM2 [bp]	250-300	220-320	450-600
Nejintenzivnější signál pPGM2 [bp]	270		500

Obrázek 1: pBS



obrázek 2: pPGM2



Obrázek 1: Polyakrylamidová elektroforéza fragmentů pBS: jednotlivé dráhy: (1) pozitivní kontrola pBS štěpený enzymy *SacI* a *PvuII*, vznikají dva fragmenty o délce 220 a 228 bp. (2) negativní kontrola: pBS štěpený *SacI*, inkubace s TdT bez přidání nukleotidů. (3) pBS štěpený *SacI*, prodloužení volných konců pomocí TdT s dATP v nižším poměru k volným koncům DNA, štěpený *PvuII*; (4) pBS: *SacI*, TdT s dATP ve vyšším poměru k volným koncům DNA, *PvuII*; (5) pBS: *SacI*, TdT s dTTP v nižším poměru, *PvuII*; (6) pBS: *SacI*, TdT s dTTP ve vyšším poměru, *PvuII*. (7) 100 bp standard DNA fragmentů.

Obrázek 2: Polyakrylamidová elektroforéza fragmentů pPGM2: jednotlivé dráhy: (1) negativní kontrola: pPGM2: štěpený *SacI*, inkubace s TdT bez přidání nukleotidů; (2) negativní kontrola: pPGM2 štěpený *SacI*, inkubace s dATP ve vyšším poměru a pufrem pro TdT, bez TdT; (3) negativní kontrola: pPGM2 štěpený *SacI*, inkubace s dATP ve vyšším poměru; (4) pPGM2: štěpený *SacI*, prodloužení volných konců pomocí TdT s dATP v nižším poměru, štěpený *PvuII*; (5) pPGM2 štěpený *SacI*, prodloužení volných konců pomocí TdT s dATP (1:5), štěpený *PvuII*; (6) pPGM2: *SacI*, TdT s dTTP v nižším poměru, *PvuII*; (7) pPGM2: *SacI*, TdT s dTTP ve vyšším poměru, *PvuII*

Závěr

Polyakrylamidová elektroforéza ukázala, že je možné za daných podmínek detekovat změny v délce fragmentů lišící se o několik nukleotidů. Prvním viditelným důkazem bylo oddělení elektroforetických proužků odpovídajících 220 a 228 bp.

Z obrázků 1 a 2 je viditelné, že v přítomnosti obou nukleotidů TdT účinně prodloužila volné konce DNA. Je také zachován předpoklad, že s větším množstvím dostupných dNTP vznikaly delší prodloužené úseky (obr. 1: starty 4 a 6; obr. 2: starty 5 a 7). Špatně detekovatelná byla DNA, kde jednořetězcové úseky vznikly prodloužením pomocí TdT s vyšší koncentrací

dTTP v reakční směsi. dATP se v obou koncentracích prokázal v daném pokusu jako vhodnější substrát pro terminální deoxynukleotidyltransferázy, protože poskytuje lépe hodnotitelný signál.

Pokusy ukázaly, že výsledky z polyakrylamidové elektroforézy bude možné využít ke srovnání při testování elektrochemických metod v detekci apoptózy.

Poděkování

Práce byla realizována v rámci projektu Institut environmentálních technologií, reg. č. CZ.1.05/2.1.00/03.0100 podporovaného Operačním programem Výzkum a vývoj pro Inovace, financovaného ze strukturálních fondů EU a ze státního rozpočtu ČR.

Literatura

- [1.] ELMORE, S. *Apoptosis: a review of programmed cell death*, 2007. Toxicol Pathol. Roč.4, č. 35, s. 495-516
- [2.] ŠMARDA, J., DOŠKAŘ, J., PANTUŮČEK, R., RŮŽIČKOVÁ, V., & KOPTÍKOVÁ, J. *Metody molekulární biologie*. 1. vydání Brno: Masarykova univerzita, 2008. ISBN 978-80-210-3841-7
- [3.] YASUHARA, S., ZHU, Y., MATSUI, T., TIPIRNENI, N., YASUHARA, Y., KANEKI, M., ROSENZWEIG, A., & MERTYN, J. A. J. *Comparison of Comet assay, Elektrom microscopy, and Flow cytometry for detection of apoptosis*, 2003. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry roč. 7,č. 51, s. 873-885.

Abstract

Apoptosis has been one of the most studied cell properties. This controlled process allows the organism to maintain homeostasis and its functionality. Disorders of cell apoptosis lead to many diseases. Development of detection methods have recently been focused mainly on the area of detecting the fragmented DNA. The group of qualitative methods include gel electrophoresis. The aim of this study was to optimize the conditions for the use of polyacrylamide gel electrophoresis for the detection of plasmid DNA fragments. plasmid pBS and a derivated form pPGM2 were used for experiments. The restriction endonucleases *SacI* and *PvuII* were used to obtain fragments about appropriate lengts. The basic length of the created fragments was 220, 228 in the case pBS and 220, 254 bp in the case pPGM2. The DNA fragments have been extended by using the terminal deoxyribonukleotidyl transferase. Distribution of fragments by using the polyacrylamide electrophoresis showed that dATP is a suitable substrate for TdT, and the method can be used as a reference to electrochemical detection methods.

Key words: *apoptosis; detection; electrophoresis; plasmid*