MEDETOX

Inovativní metody monitorování emisí z naftových motorů v reálném městském provozu
(LIFE10 ENV/CZ/651)

STANOVENÍ DNA ADUKTŮ POLYAROMATICKÝCH LÁTEK METODOU ^{32}P - POSTLABELINGU

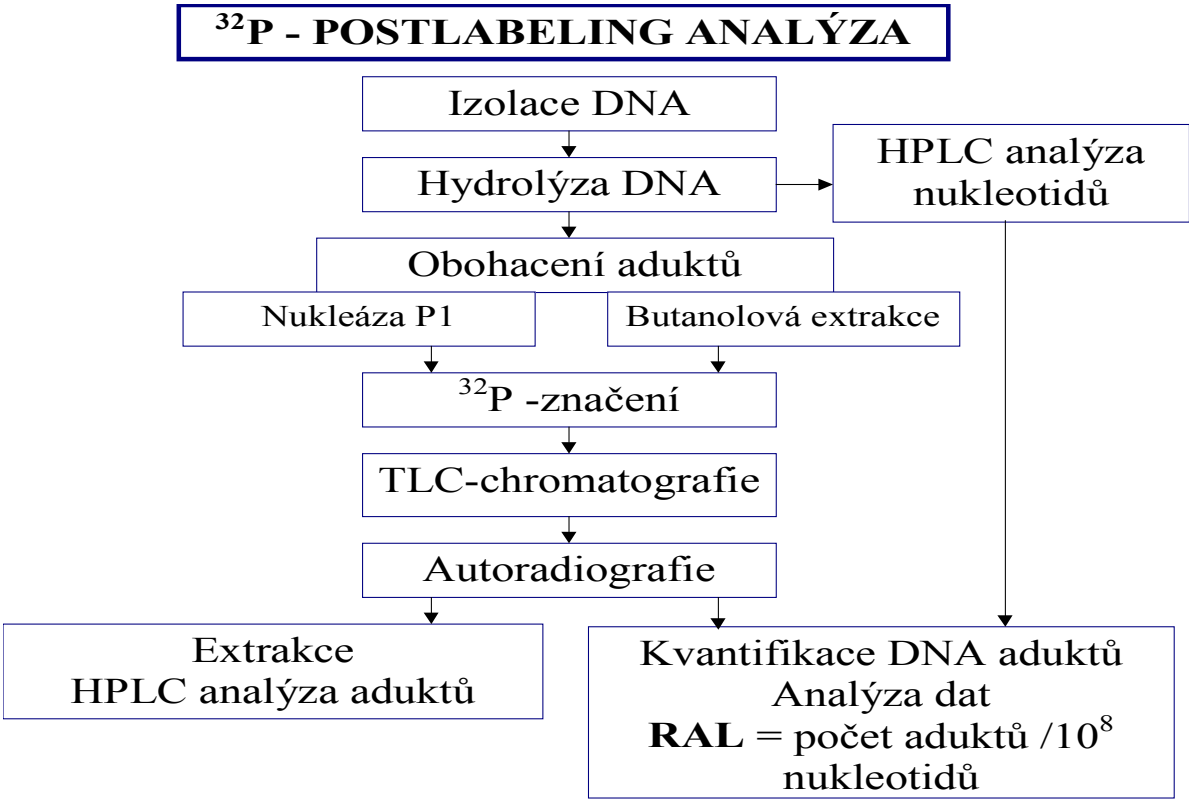
O B S A H

1. Princip stanovení DNA aduktů metodou ^{32}P-postlabelingu
2. Referenční materiály a omezení metody
3. Inkubace buněk a calf thymus DNA
4. Izolace DNA
5. Hydrolýza DNA
6. Nuclease P1 pro obohacování DNA aduktů
7. Značení DNA aduktů pomocí ^{32}P-ATP
8. Tenkovrstvá chromatografie (TLC) k separaci DNA aduktů
9. Vyhodnocování chromatografických map DNA aduktů
10. Stanovení celkové koncentrace nukleotidů pomocí HPLC
11. Výpočet hladin DNA aduktů

1. Princip stanovení DNA aduktů polyaromatických látek ("bulky aromatic adducts") metodou ^{32}P-postlabelingu

Princip metody sestávající z několika následných biochemických reakcí je schematicky znázorněn na **obr.1**. DNA izolovaná z tkáně nebo buněk je nejprve enzymaticky hydrolyzována působením směsi enzymů (mikrokokální nukleáza a fosfodiesteráza) na nukleosid-3'-monofosfáty. Dalším krokem je separace modifikovaných nukleotidů od nukleotidů intaktních, která není nikdy dokonalá, a proto bývá označována jako obohacování aduktů. Jedna varianta využívá k oddělení aduktů extrakce do butanolu, druhá specifické enzymové aktivity nukleázy P1, která odštěpuje zbývající fosfát z nukleosid-3'-monofosfátu preferenčně u normálních nukleotidů. Vzniklé nukleosidy jsou pak špatným substrátem pro T4-polynukleotidkinázu, která přenáší radioaktivní fosfát z adenosin-5'-trifosfátu (ATP) na nukleosid-3'-monofosfáty. Dalším krokem je značení radioaktivním fosforem. Ten je přenesen ve formě fosfátu z [^{32}P]-ATP (přítomen v molárním nadbytku) na 5'- hydroxylový konec modifikovaných nukleotidů působením T4-polynukleotidkinázy. Vzniká nukleosid-3',5'-bifosfát. Takto označené adukty jsou v dalším postupu děleny vícerozměrnou tenkovrstvou chromatografií (TLC) s použitím polyethylenimin-celulosových folií. Chromatografie ve směrech D1, D2 a D5 se používá k odmytí nežádoucích radioaktivních komponent pro dosažení optimálního pozadí. Chromatografie D3 a D4 s mobilní fází o vysoké iontové síle, s kyselým (D3) resp. alkalickým (D4) pH, slouží k rozdělení aduktů s rozdílnou pohyblivostí za daných chromatografických podmínek, která je určována jejich chemickou strukturou. Separace aduktů je závislá nejenom na celkové iontové síle, ale i na pH, koncentraci močoviny a povaze aniontů. Vyvolané chromatogramy jsou vyhodnocovány autoradiograficky s použitím citlivého filmu a délkou expozice 1-5 dnů při -80 °C pro detekci 1 aduktu v 10^8-10^{10} nukleotidech. Radioaktivita se měří na scintilačním spektrometru. Koncentrace DNA aduktů se vyjadřuje počtem aduktů na 10^8 nukleotidů. Tyto hodnoty mohou být snadno převedeny na veličinu fmol aduktů /µg DNA (1 adukt/10^7 nukleotidů = 0.3 fmol aduktů /µg DNA).

Obr. 1


^{32}P - POSTLABELING ANALÝZA
Izolace DNA
Hydrolýza DNA
HPLC analýza nukleotidů
Obohacení aduktů
Nukleáza P1
Butanolová extrakce
^{32}P -značení
TLC-chromatografie
Autoradiografie
Extrakce
HPLC analýza aduktů
Kvantifikace DNA aduktů
Analýza dat
RAL = počet aduktů /10^8 nukleotidů

1

2. Referenční materiály a omezení metody

Pro tuto metodu neexistují komerčně vyráběné standardy DNA aduktů. Každá laboratoř si potřebné standardy musí připravit sama.

B(a)P-DNA standard - 4 adukty/10^8 nukleotidů -byl připraven izolací DNA z jater krysy, které bylo perorálně aplikováno 100 mg B(a)P/kg tělesné hmotnosti. Tento standard je uchováván v alikvótech (20 µl) při -80 °C. Standard se používá při každém poslabelingovém experimentu v triplikátech pro kontrolu všech postupů, které budou dále podrobně uvedeny.
Pro kontrolu možné kontaminace v jednotlivých postupech provádíme v každém experimentu všechny procedury současně s 3 blankovými vzorky (místo DNA alikvót HPLC vody), které současně používáme pro korekci pozadí.

3. Inkubace buněk a calf thymus DNA

Calf thymus DNA (CT DNA 1mg/ml) inkubujeme se vzorky extraktů (za aerobních podmínek bez a s metabolickou aktivací (s přidáním S9 mikrosomální frakce) ve vodní lázni při teplotě 37˚C, 24h. V každé inkubaci je použita pozitivní kontrola (1 uM B[a]P) a negativní kontrola (DMSO).
Buňky A549 kultivujeme v 72 cm^2 lahvích s 15-30 ml kultivačního média (DMEM s 10% FBS, 2% L-glutaminem, 0,4% gentamicinem) do 70-80% konfluence. Poté buňky inkubujeme v aplikačním médiu (DMEM s 1% FBS, 2% L-glutaminem, 0,4% gentamicinem) se vzorky extraktů v termostatu při teplotě 37 °C, 24h. Následuje nesterilní sklízení buněk.

Chemikálie a roztoky

Inkubace calf thymus DNA
Mikrosomální S9 frakce jaterního homogenátu potkanů – (Výzkumný ústav organických syntéz a.s., Rybitví)
DNA z telecího brzlíku Calf thymus DNA (Sigma D 1501)
Glukoso-6-fosfát (Sigma G 7879)
NADP (Sigma N 0505)
DMSO - Dimethyl sulfoxide (Sigma D2650)
Pufr A: 1.65 M KCl + 0.4 M $MgCl_2$
Pufr B: Fosfátový pufr 0.2 M, pH = 7.4: 60 ml 0.2 M NaH_2PO_4 + 440 ml 0.2M Na_2HPO_4

Inkubace buněk A549
Dulbecco´s modified Eagle´s medium (DMEM) with 1.0 g/L glucose, with pyruvate, without L glutamine (LONZA BE12-707F/12)
Fetal bovine serum (FBS), EU standard (LONZA DE14-801F/12)
L-glutamine (200 mM) (LONZA BE17-605E)
Gentamicin sulfate 10 mg/ml (LONZA 17-519L)
Trypsin/EDTA (1x) contains 0.5 g/L trypsin 1:250 and 0.2 g/L Versene® (EDTA) (LONZA BE17-161E)
DMSO (Sigma D2650)

Postup sklízení buněk

1. Buňky seškrábeme pomocí škrabky, převedeme do 15 ml zkumavek označených názvem projektu Medetox a čísly vzorků.
2. Kultivační lahvičky propláchneme cca 4 ml fyziologického roztoku a tento zbytek buněk přidáme do příslušných zkumavek. Zkumavky zcentrifugujeme při 3000 ot/min, 5 min.
3. Supernatant slijeme, pelet buněk zvortexujeme, přidáme cca 13 ml fyziologického roztoku a zcentrifugujeme při 3000 ot/min, 5 min. Toto promytí buněk se **2x** opakuje.
4. Nakonec zcentrifugujeme při 3000 ot/min, 5 min, supernatant odsajeme, pelet buněk zvortexujeme a pokračujeme s izolací DNA (kap. 4) či buňky zamrazíme v mrazícím boxu při -80 °C pro pozdější izolaci DNA.

4. Izolace DNA

Izolaci DNA provádíme buď z čerstvě sklizených buněk a CT DNA nebo ze zamražených vzorků okamžitě po jejich rozmražení. Vzorky izolované DNA řádně označené názvem studie Medetox, číslem vzorku, koncentrací DNA a datem izolace uchováváme v mrazícím boxu při -80°C.

Chemikálie a roztoky

Extrakční pufr: 1 % SDS, 10 mM EDTA, 20mM Tris

Pro přípravu 1 l roztoku (uchováváme při teplotě místnosti):

2,42 g Tris (M.W 121.1)
3,723 g EDTA (M.W.372.3)
10 g Sodiumdodecylsulphate-SDS (M.W.268.4)

1 M Tris, pH=8 (uchováváme při teplotě místnosti)

12,1 g/100 ml H_2O, pH nastavujeme pomocí HCl

5M NaCl (uchováváme při teplotě místnosti)

29,23 g/ 100 ml H_2O

50 mM Tris, pH 7.4, k přípravě roztoků CIP a CI

1.21 g / 200 ml, pH nastavujeme pomocí HCL

CIP - chloroform : izoamylalkohol : fenol (24 : 1 : 25)

250 g fenol, redestilovaný (Sigma**,** 328111)
240 ml chloroform (Merck, 1.02445)
10 ml izoamylalkohol (Sigma I 0640)
Fenol rozpusíme ve vodní lázni při 50 °C. Po rozpuštění všechny složky smícháme a důkladně protřepeme s 80 ml 50 mM Tris pH=7.4 (nasycení směsi CIP Trisem) a směs necháme stát přes noc. Nadbytek roztoku Trisu vytvoří vrstvu na povrchu CIP směsi.

CI - chloroform : izoamylalkohol (24 : 1)

240 ml chloroform (Merck 1.02445)
10 ml izoamylalkohol
Smícháme a protřepeme s 80 ml 50 mM Tris pH=7.4 (viz. CIP)

RNA mix = Ribonuclease A 10mg/ml (Sigma, R-5125)***, Ribonuclease T1 5000 U/ml*** (Sigma R-1003)
Připravíme roztok RNAzy-A 10mg/ml v 50 mM Tris pH=7.4. Zahřejeme na 80 °C po dobu 10 minut a necháme vychladnout. 1 ml tohoto roztoku přepipetujeme do ampulky s RNAzou-T1

(5000 U/ampulka) a jemně promícháme. Rozpipetujeme po menších alikvotech (200 *µl*) a uchováváme v mrazícím boxu při -20 °C.

Proteinaza K (20 mg/ml H_2O) (Sigma, P-6556)

Roztok připravujeme ***vždy před použitím čerstvý.***

Materiál

15 ml zkumavky s gelem (PLG Light, Eppendorf 2302840)

Potřebné přístroje

pH-metr, Beckman
Centrifuga Savant Speed fuge HSC 10K, centrifuga Eppendorf 5810 R
Vortex MS2 Minishaker IKA, vortex Bio vortex V1 BIOSAN
Termobloky Thermodual Liebisch, termoblok DRI-BLOCK DB.3D
Vodní lázeň GFL 1086
Spektrofotometr Nanodrop
Evaporater - vakuová odparka Jouan RC10.22., RCT 90

Postup izolace DNA

1. Rozmražené nebo čerstvé vzorky buněk či calf thymus DNA resuspendujeme v 1.5 ml extrakčního pufru (1% SDS,10 mM EDTA, 20 mM Tris) v 15 ml plastikových zkumavkách s uzávěrem.
2. Přidáme ***30 µl RNA-mix*** (10 mg/ml RNAza A, 5000 U/ml RNAza T), jemně promícháme a inkubujeme 1,5 hodiny v lázni 37 °C.
3. Přidáme ***30 µl proteinázy K*** (20 mg/ml), promícháme a inkubujeme 2 hodiny při 37°C.
4. Po skončení inkubace směs přeneseme pomocí umělohmotných jednorázových pasterek do 15 ml umělohmotných zkumavek s gelem a ke každému vzorku přidáme ***75 µ1 M Tris, pH=8, 150 µl 5M Na Cl a 1.5 ml CIP***. Extrakce se provádí v digestoři vzhledem k vysoké toxicitě fenolu. Zazátkujeme a intenzivně ručně protřepeme 100x. Zcentrifugujeme na centrifuze Eppendorf při 3000 ot/min.po dobu 5 minut.
5. Odebereme *vrchní vodnou fázi* do nově připravených 15 ml zkumavek a přidáme ***1.5 ml CI***. Zazátkujeme, opět intenzivně protřepeme a zcentrifugujeme při 3000ot/min., 5 minut.
6. Odebereme *vrchní vodnou fázi* do nových 5 ml zkumavek a přidáme ***150 µl 5M NaCl a 1.5 ml ledového absolutního etanolu*** (Merck, 1.11727). Zkumavky zazátkujeme. Při pomalém otáčení

zkumavky dojde k vysrážení DNA. Zcentrifugujeme na centrifuze Savant při 3000ot/min., 5 minut. Ethanol opatrně odsajeme a DNA vysušíme v evaporateru.

7. Pelet DNA rozpustíme v přiměřeném množství redestilované H_2O podle množství vysrážené DNA (optim. výsledná koncentrace 0.8 - 1.5 mg/ml). Dobře protřepeme na vortexu a DNA necháme rozpouštět přes noc při teplotě místnosti.
8. Po rozpuštění DNA změříme její koncentraci spektrofotometricky na přístroji Nanodrop. V případě koncentrací 〉 2.0 µg/µl vzorek naředíme a měření opakujeme. Poměr absorbancí A_{260}/A_{280} slouží pro kontrolu čistoty DNA. Tento poměr by měl být kolem hodnoty 1.80 pro čistou DNA - bez kontaminace RNA a proteiny. Vyšší hodnota ukazuje na kontaminaci RNA, nižší na kontaminaci bílkovinami.
9. Po změření koncentrace DNA vzorky přepipetujeme do 1.5 ml eppendorfek a označíme štítkem s popisem studie Medetox, číslem vzorku, koncentrací DNA a datem izolace. Vzorky pak uložíme do mrazícího boxu na -80 °C.
10. Údaje o vzorcích DNA evidujeme na počítači v programu Excel.

5. Hydrolýza DNA

Tímto postupem se zahajuje vlastní postlabelingový experiment, který trvá 1-2 týdny, podle typu a počtu vzorků DNA vybraných pro experiment. Současně lze v jednom experimentu analyzovat 30 max. však 100 vzorků DNA. V tomto kroku je DNA enzymaticky hydrolyzována působením směsi enzymů (mikrokokální nukleáza a fosfodiesteráza) na nukleosid-3'-monofosfáty.

Chemikálie a materiál

Micrococcal nuclease (MN, Sigma N 3755; 1 bal MN = 200 U)
Spleen phosphodiesterase (MP Biomedicals 0210097701)
Ostatní Sigma (analytical grade)
Dialyzační membrane trubička Spectopor 6.4 mm
1,5 ml zkumavky (Eppendorf, Axygen)

Roztoky

MN/SPD mix: 50 U MN/ml a 1mg SPD/ml (odpovídá 2 U/ml)

Suspenzi SPD (1 balení obsahuje 2 mg SPD v 1 ml) před přípravou mixu přepipetujeme do dialyzační trubičky dlouhé cca. 12 cm (Spectopor tubing 6.4 mm), kterou na obou koncích fixujeme dialyzačními svorkami. Ty umístíme co nejblíže k objemu SPD abychom zabránili nadměrnému zvětšení objemu při dialýze (max. do 2 ml). Totéž provedeme i s druhým balením SPD. Obě dialyzační trubičky ponoříme do 2 l HPLC vody v kádince a dáme na 2 h do lednice. Po 2 h vodu v kádince vyměníme a necháme další 2 h dialyzovat. Po skončené dialýze přeneseme objem SPD z obou dialyzačních trubiček do malé kádinky a doplníme na celkový objem 4 ml. Tento objem přepipetujeme do lahvičky s MN (1 bal MN=200U) a celý obsah lahvičky po zazátkování opatrně promícháme. Po rozpuštění MN obsah MN/SPD mix rozpipetujeme (alikvóty 200 µl a 500 µl) do 1.5 ml ependorfek s popisem a datem přípravy.
Alikvóty uchováváme v mrazícím boxu při – 20 °C (max. však 4 měsíce).

Hydrolyzační pufr

100 mM Na Succinate pH=6.0
50 mM $CaCl_2$
Pro přípravu 100 ml roztoku: 2.7 g Na Succinate (M.W.= 270.1), 0.368 g $CaCl_2$ (M.W.=147). pH nastavujeme pomocí HCl.
100 µl alikvóty uchováváme v mrazícím boxu při – 20 °C.

Hydrolyzační mix

MN/SPD mix : Hydrolyzační pufr = 4 : 1

Připravujeme ***vždy čerstvý*** před hydrolýzou DNA vzorků v množství potřebném pro experiment.

Potřebné přístroje

Centrifuga Savant Speed fuge HSC 10K, centrifuga Spectrafuge 24D Labnet
Vortex MS2 Minishaker IKA, vortex Bio vortex V1 BIOSAN
Termobloky Thermodual Liebisch, termoblok DRI-BLOCK DB.3D

Podmínky hydrolýzy DNA

Množství DNA na jeden vzorek:	6 µg
Výsledná koncentrace DNA ve směsi	0.4 µg/µl
MN ve vzorku:	0.3 U
SPD ve vzorku:	12 mU
pH	6.0
Celkový objem vzorku:	15 µl
Doba inkubace:	4 h
Teplota:	37 °C

Postup hydrolýzy DNA

1. Objemové množství vzorku odpovídající 6.0 µg DNA napipetujeme do zkumavek à 1.5 ml a doplníme redestilovanou vodou na celkový objem 7.5 µl (jsou-li vzorky DNA příliš zředěné, nutno předem odpařit a odparek rozpusit v 7.5 µl HPLC vody).
2. Připravíme potřebné množství MN/SPD mixu. Ke každému vzorku napipetujeme 7.5 µl takto připraveného enzymového mixu. Vzorky promícháme a krátce zcentrifugujeme (5000 ot/min, 20 sec).
3. Ependorfky se vzorky umístíme do termobloku s teplotou nastavenou na 37 °C a necháme 4 h inkubovat.
4. Po skončené inkubaci vzorky krátce zcentrifugujeme (5000 ot/min, 20 sec). Z objemu 15 µl každého vzorku odpipetujeme 2.5 µl do nově označených eppendorfek. Tyto alikvóty slouží pro stanovení koncentrace nukleotidů (dC, dG, dT, dA) pomocí HPLC. Alikvóty uchováváme v mrazícím boxu při – 20 °C až do HPLC analýzy.
5. Zbývající objem ***12.5 µl = "DNA-digest"*** (odpovídá cca. 5 µg DNA) se dále podrobuje obohacovacím postupům uvedeným dále (butanolová extrakce, nuclease P1). Obohacovací postupy se provádí buď bezprostředně po skončené hydrolýze nebo lze tyto alikvóty (12.5 µl a' vzorek) zamrazit a uchovat do druhého dne v mrazícím boxu při – 20 °C.

6. Nuclease P1 pro obohacování DNA aduktů

Tento postup je jedním ze způsobu obohacování DNA aduktů, který využívá specifické enzymové aktivity nukleázy P1. Ta odštěpuje zbývající fosfát z nukleosid-3'-monofosfátu preferenčně u normálních nukleotidů. Vzniklé nukleosidy jsou pak špatným substrátem pro T4-polynukleotidkinázu, která přenáší radioaktivní fosfát z adenosin-5'-trifosfátu (ATP) na nukleosid-3'-monofosfáty. Tento postup provádíme vždy bezprostředně před vlastním značením vzorků. Vzorky po inkubaci s nuclease P1 nikdy nezamražujeme.

Chemikálie

Nuclease P 1 from Penicillium cintrinum 500 U (Yamasa corporation 8801)
Ostatní Sigma (analytical grade)

Roztoky

0.64 M Na-acetate pH = 5.0

2.178 g Na-acetate (M.W.=136.1) rozpustíme ve 20 ml a nastavíme pH pomocí zřeď. kyseliny octové. Doplníme na objem 25 ml. 150 µl alikvóty uchováváme v mrazícím boxu při – 20 °C

3.2 mM $ZnCl_2$

10.9 mg $ZnCl_2$ (M.W.=136.3) rozpustíme v 25 ml HPLC vody.
150 µl alikvóty uchováváme v mrazícím boxu při – 20 °C.

1.36 M Tris pH = 9.5

4.12 g Tris (M.W.=121.1) rozpustíme v 25 ml HPLC vody
150 µl alikvóty uchováváme v mrazícím boxu při – 20 °C

10 mM Na acetate pH = 5.0

Připravíme naředěním roztoku 0.64 M Na-acetate pH = 5.0
(100 µl roztoku + 6.3 ml HPLC vody)
200 µl alikvóty uchováváme v mrazícím boxu při – 20 °C

Nuclease P1

1 mg rozpustíme v originální lahvičce ve 150 µl HPLC vody a použijeme ihned k přípravě P1-mixu. Zbytek zamrazíme na – 20 °C.
Pro další použití může být uchovávána při – 20 °C nejdéle 4 týdny.

Potřebné přístroje

Centrifuga Savant Speed fuge HSC 10K, centrifuga Spectrafuge 24D Labnet
Vortex MS2 Minishaker IKA, vortex Bio vortex V1 BIOSAN
Termobloky Thermodual Liebisch, termoblok DRI-BLOCK DB.3D

Podmínky NUCLEASE P1

Množství hydrolyzátu DNA:	12.5 µl "DNA digest"
Nuclease P1 na vzorek :	2.4 U
pH:	5.0
Celkový objem vzorku při P1 postupu:	18.5 µl
Doba inkubace:	30 min
Teplota při inkubaci:	37 °C
Ukončení reakce:	1 µl 1.36 M Tris
Celkový objem na konci procedury:	16.5 µl

Postup Nuclease P1

1. Připravíme P1-mix v množství potřebném pro daný set vzorků.

   Složení pro jeden vzorek: 1 µl nuclease P1
   1 µl 0.64 M Na acetate, pH=5.0
   1 µl 3.2 mM $ZnCl_2$

2. Ke každému vzorku (12.5 µl DNA digest) přidáme 3 µl P1-mixu, jemně zamícháme na vortexu a krátce zcentrifugujeme (5000 ot/min, 30 sec).
2. Vzorky inkubujeme v termobloku při 37 °C po dobu 30 min.
3. Po skončené inkubaci krátce zcentrifugujeme (5000 ot/min, 30 sec) a ke každému vzorku přidáme 1 µl 1.36 M Tris.
4. Vzorky dáme do lednice po dobu než můžeme zahájit značení v izotopové laboratoři.

7. Značení DNA aduktů pomocí ^{32}P-ATP

V této proceduře je radioaktivní fosfor přenesen ve formě fosfátu z [^{32}P]-ATP (přítomen v molárním nadbytku) na 5'- hydroxylový konec modifikovaných nukleotidů působením T4-polynukleotidkinázy. Vzniká nukleosid-3',5'-bifosfát. Provádí se v izotopové laboratoři při dodržování všech bezpečnostních předpisů.

Chemikálie

^{32}P-ATP 3000 Ci/mmol; 1 mCi/100µl (Perkin Elmer BLU0024)
T4 Polynucleotide kinase (PNK) 30 U/µl (USB, #70031)
Ostatní Sigma (analytical grade)

Roztoky

Značící pufr pH=9.0

230 mM Bicine
115 mM Magnesium Chloride
115 mM Dithiothreitol (DTT; D-0632)
5.8 M Spermidine (S-2626)
Pro přípravu 25 ml roztoku naváží me: 0.9385 g Bicine (M.W.=163.2); 0.274 g Mg Cl_2; 0.443 g DTT (M.W.=154.2); 0.2105 g Spermidine (M.W.=145.2). pH nastavujeme opatrně pomocí 1 N NaOH.
150 µl alikvóty uchováváme v mrazícím boxu při – 20 °C

Potřebné přístroje

Termobloky Thermodual Liebisch, termoblok DRI-BLOCK DB.3D
Ochranné pomůcky pro práci v izotopové laboratoři

Podmínky značení

Množství DNA:	5 µg
T4 PNK na vzorek:	3.6 U
ã-^{32}P-ATP na vzorek:	24.2 µCi
pH:	9.5
Celkový objem během značení:	24 µl (P1)
Doba inkubace:	30 min
Teplota při inkubaci:	37 °C

Postup značení

1. Připravíme ATP-mix o objemu potřebném pro daný set vzorků. Pro jedno balení ATP o aktivitě 1 mCi (37 MBq) a objemu 100 µl má ATP-mix následující složení:

Značící pufr	60 µl
P N K	8 µl
HPLC voda	142 µl
^{32}P-ATP	100 µl
Celkový objem	**310 µl (pro max 40 vzorků)**

   Mix nevortexujeme, pouze JEN opakovaně promícháme (cca 10 x) špičkou.

2. Ke každému vzorku přidáme 7.5 µl ATP-mixu a opatrně promícháme špičkou. Vzorky krátce zcentrifugujeme dáme do termobloku a inkubuje 30 min při teplotě 37 °C.

3. Po skončené inkubaci vzorky nanášíme na chromatografické folie, které umístíme do chromatografických tanků s roztokem D1.

8. Tenkovrstvá chromatografie k separaci DNA aduktů

DNA adukty, označené ^{32}P podle postupu uvedeném v předchozí kapitole, jsou v dalším postupu děleny vícerozměrnou tenkovrstvou chromatografií (TLC) s použitím polyethylenimin-celulosových folií. Chromatografie ve směrech D1, D2 a D5 se používá k odmytí nežádoucích radioaktivních komponent pro dosažení optimálního pozadí. Chromatografie D3 a D4 s mobilní fází o vysoké iontové síle, s kyselým (D3) resp. alkalickým (D4) pH, slouží k rozdělení aduktů s rozdílnou pohyblivostí za daných chromatografických podmínek.

Chemikálie a materiály

Chemikálie Sigma (analytical grade)
POLYGRAM CEL 300 PEI chromatografické folie, 20x20 cm, 0.1 mm (Macherey-Nagel, Germany)
Filtrační papír Whatman č. 3
Fluorescenční pero (Autoradiography pen Sigma Z36,351-0)
Rentgenové filmy 35x43 cm a 20.3x25.4 cm (Kodak BioMax MRfilm)
Vývojka G153, ustalovač G354 (Agfa)
Autoradiografické kazety (Hypercassette™ 35x 43 cm a 20.3x25.4 cm, Amersham)

Roztoky

D1: ***1 M Sodium phosphate, pH = 6.8***

Příprava 2 l roztoku:
276 g $NaH_2PO_4.H_2O$ (M.W.=138) nebo
240 g NaH_2PO_4 (M.W.=119.98) rozpustíme v 1.5 l HPLC H_2O
Nastavíme pH pomocí conc. NaOH to 6.8 a doplníme objem na 2 l.

D2: ***2.5 M Ammonium formate, pH = 3.5***

Příprava 500 ml roztoku:
50 ml formic acid (99%) smícháme s 300 ml HPLC H_2O a
cca. 20 - 30 ml 25% NH_4OH (27%) až do pH = 3.5
Doplníme na objem 500 ml

D3: ***3.5 M LiF, 8.5 M Urea, pH = 3.5***

Příprava 2 l roztoku:
1020 g urea (M.W.=60.16) rozpustíme v 1,5 l HPLC H_2O a přidáme
277.4 ml formic acid (99%)
Nastavíme pH pomocí LiOH na hodnotu 3.5
Doplníme objem na 2 l.

D4-A: 0.5 M Tris, pH = 8.0

Příprava 1 l roztoku:
60.55 g Tris (M.W.=121.1) rozpustíme v 900 ml HPLC vody
Nastavíme pH pomocí 1 N HCl a doplníme objem na 1 l

D4: 0.8 M LiCl, 0.5 M Tris, 8.5 M Urea, pH = 8.0

Příprava 2 l roztoku:
1020 g urea
121.1 g Tris (M.W.=121.1)
67.84 g LiCl (m.W.=42.4)
Rozpustíme v 1,5 l HPLC H_2O
Nastavíme pH pomocí conc. HCl na hodnotu 8.0
Doplníme objem na 2 l.

D5 = D1: 1 M Sodium phosphate, pH = 6.8

Potřebné přístroje

Chromatografické a promývací tanky
El. vysoušeče (vlasové)
Prosvětlovací zařízení na folie
Hypercassette™ 35x 43 cm a 20.3x25.4 cm , Amersham, USA
Automatický vyvolávač rentgenových filmů CURIX 60, Agfa
Ochranné pomůcky pro práci v izotopové laboratoři

Podmínky chromatografie

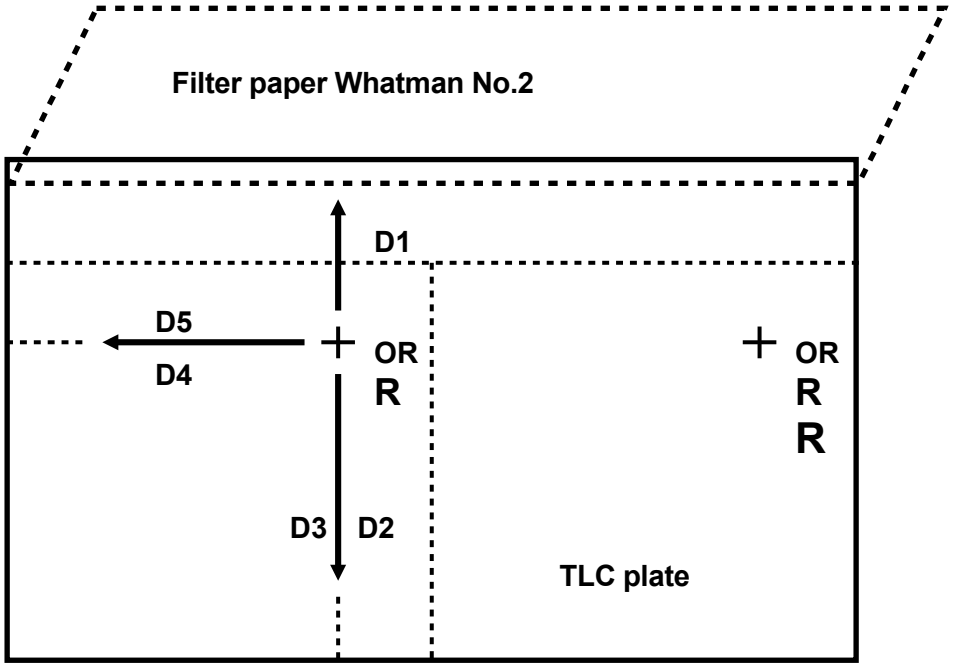
Chromatografie D1 - D5 je schematicky zobrazena na obr.č.2.

D1 probíhá přes noc na konec filtrační pásky (10x20 cm, Whatman č.3) přisponkované k folii, min. 15 h
D2 vyvíjení až k počátku (OR) s nanesenými adukty (cca 1 min)
D3 3.5 h
D4 3 h
D5 přes noc, až na konec filtrační pásky (10x7 cm, Whatman č.2) přisponkované k folii, min. 15 h

Postup chromatografie

1. Rozkreslení chromatografických folií (**obr.č.2**) podle předlohy provádíme na prosvětlovacím zařízení, nejlépe před zahájením postlabelingového experimentu (před hydrolýzou). K rozkresleným a seříznutým foliím přisponkujeme filtrační pásky 10x20 cm. Takto jsou folie připraveny pro nanášení vzorků.
2. Vzorky po označení γ-^{32}P-ATP podle postupu uvedeném v kap.7, kvantitativně nanášíme na vyznačený počátek OR a fólie ihned vložíme do chromatografických tanků s roztokem D1 (tank pro 16 vzorků - 180 ml D1). Necháme vyvíjet přes noc.
3. Ráno odstřihneme filtrační pásky podle vyznačené linie a folie ponoříme s nosníkem do promývacího tanku s dest. vodou. Destilovanou vodu necháme mírně protékat tankem po dobu 20 min.
4. Po skončení promývání vyjmeme fólie s nosníkem a umístíme je pod vysoušeče. Sušíme opatrně s mírným ohřevem cca. 15-20 min. Suché folie ponoříme do fotomisky s roztokem D2 a necháme vyvinout až po OR (trvá asi 1 min). Ihned vložíme do tanku s roztokem D3 (tank pro 16 vzorků - 180 ml D3) a vyvíjíme 3.5 h.
5. Po této době vyjmeme fólie z tanku, odstřihneme vrchní 2 cm pás fólie a rozstřihneme uprostřed podle vyznačených liniích. Promyjeme (20 min) a vysušíme stejným způsobem jako po D1.
6. Suché folie krátce ponoříme ve směru chromatografie D4 do roztoku D4-A ve fotomisce a ihned vložíme do chromatografického tanku s roztokem D4 (tank pro 16 vzorků - 180 ml D4) a vyvíjíme 3 h.
7. Po skončení fólie opět promyjeme (20 min) a vysušíme stejným způsobem jako v předchozím případě. K vysušeným fóliím přisponkujeme filtrační pásky 10x7 cm na koncovou stranu chromatografie D4, vložíme do tanku s roztokem D5 a necháme vyvíjet přes noc.
8. Následující den ráno odstřihneme filtrační pásky, fólie opět prymyjeme a vysušíme. Každou fólii označíme číslem a v rozích 2 tečkami pomocí fluorescenčního pera. Umístíme do předem vyčištěných autoradiografických kazet. Ve fotokomoře vložíme filmy X-ray KODAK a necháme exponovat v mrazícím boxu při teplotě -80°C po dobu 1-5 dnů podle typu vzorků.
9. Filmy po skončené expozici vyvoláme v automatickém vyvolávači rentgenových filmů.

Obr. 2



9. Vyhodnocování chromatografických map DNA aduktů

Vyvolané rentgenové filmy představují mapu DNA aduktů, resp. spotů, na chromatografických foliích pro jednotlivé analyzované vzorky. Pro daný set vzorků se zvolí vhodný templát mapy spotů a diagonální radioaktivní zóny (DRZ) pro jejich vystřihování, který pak používáme pro všechny vzorky v této studii. Aktivita vystřižených spotů a DRZ se měří na kapalném scintilačním počítači.

Chemikálie a materiály

Scintilační koktejl LSC SigmaFluo™ (Sigma L8286)
Scintilační lahvičky (Greiner)

Potřebné přístroje

LS counter, Wallac (Pharmacia)
Ochranné pomůcky pro práci v izotopové laboratoři
Prosvětlovací zařízení Kaiser prolite basic (KFB 2176)
Dávkovač scintilačního koktejlu

Postup vyhodnocování chromatografických fólií

1. Zvolíme vhodný templát mapy spotů a diagonální radioaktivní zóny (DRZ) pro jejich vystřihování. Tento templát pak používáme pro všechny vzorky v této studii. Templát rozkreslíme na filmech u všech jednotlivých vzorků včetně blankových vzorků.
2. Podle filmu rozkreslíme templát na jednotlivé chromatografické folie s použitím prosvětlovacího zařízení a vodících značek fluorescenčního pera. Jednotlivé spoty a DRZ u každého vzorku opatrně vystříháme a vložíme do předem popsaných scintilačních lahviček. Do lahviček nadávkujeme scintilační koktejl (5 ml/lahvička), zazátkujeme a dáme měřit do scintilačního počítače. Je vždy nutné provést v programu editaci referenčního data pro γ-^{32}P-ATP použitého v daném experimentu.
3. Výsledky měření (CPM) jsou automaticky ukládány do file ve verzi LOTUS (.WKS). Současně však necháme data tisknout v textové formě na připojené tiskárně pro kontrolu měření. Je-li měření v pořádku, příslušný file přeneseme disketou do počítače s programem Excel, kde data vyhodnocujeme.

10. Stanovení celkové koncentrace nukleotidů pomocí HPLC

Pro výpočet hladin DNA aduktů je nutné znát celkovou koncentraci nukleotidů v analyzovaných vzorcích. Analýza alikvótů jednotlivých vzorků, odělených po hydrolýze DNA, se provádí pomocí HPLC.

Chemikálie a materiály

Standardy nukleotidů:
- dG- 2'-deoxyguanosine 3'-monophosphate,sodium salt, Sigma D 4147 (2 mg)
- dA- 2'-deoxyadenosine 3'-monophosphate,sodium salt, Sigma D 3139 (1 mg)
- dC- 2'-deoxycytidine 3'-monophosphate,sodium salt, Sigma D 3389 (1 mg)
- dT- thymidine 3'-monophosphate, sodium salt, Sigma T 3512 (5 mg)

Acetonitril, HPLC grade
Membránové filtry pro mobilní fázi, Waters
Chromatografická kolona SGX C18 5 ìm,4 x 250 mm, TESSEK, č.141 300013 001
Předkolona SGX C18 5 ìm, 4 x 40 mm, TESSEK, ČR

Roztoky

25 mM NaH_2PO_4 , pH=4.0 s obsahem acetonitrilu 2% - mobilní fáze

Pro přípravu 2 l roztoku rozpustíme v 1.5 l HPLC vody:
6.0 g bezvodý NaH_2PO_4 (M.W.= 120) nebo
6.9 g $NaH_2PO_4.H_2O$ (M.W.= 138)
Nastavíme pH pomocí zřeď. kyseliny fosforečné. Přidáme 40 ml acetonitrilu a doplnime do 2 l. Před použitím vždy zfiltrujeme na filtračním zařízení Waters s použitím membránového filtru pro vodné mobilní fáze.
Uchováváme v lednici nejvýše jeden měsíc.

Roztoky standardů pro kalibraci o koncentraci 100 ng dC, dG, dT a dA/µl

Nukleotidy rozpustíme (v originálních lahvičkách) v příslušném objemu HPLC vody, odpovídajícím koncentraci 1mg/µl. Naředíme 10x na koncentraci 100 ng/µl. Alikvóty po 100 µl uchováváme v mrazícím boxu při – 80 °C.

Potřebné přístroje

Centrifuga Savant Speed fuge HSC 10K, centrifuga Spectrafuge 24D Labnet
Vortex MS2 Minishaker IKA, vortex Bio vortex V1 BIOSAN
Filtrační zařízení pro mobilní fázi, Waters
HPLC systém Waters sestávající z následujích částí:
- HPLC pumpa typ 600
- Diode-array detektor typ 966

Autosampler typ 717
Osobní počítač Digital
Chromatogafický software Millenium
Laserová tiskárna HP 5P

Podmínky HPLC analýzy

Isokratické
Mobilní fáze: 25 mM NaH_2PO_4 s obsahem acetonitrilu 2 %, pH=4.0
Průtoková rychlost: 1 ml/min
Doba analýzy: 14 min (závisí na použité koloně)
Nástřikový objem vzorku: 5 µl
Kolona: Analytická, 4 x 250 mm, 5 ìm, ODS 18
Detekce: Snímání spektra v rozsahu vlnových délek 230 -320 nm; procesorování při 260 nm
Kalibrační křivky: Standardy dC, dG, dT a dA-5'-monophosphates. Kalibrace pro jednotlivé nukleotidy se provádí v rozsahu 10-30 ng.
Retenční časy: dC - 3.7 min; dG - 5.5 min; dT - 6.3 min; dA - 10.9 min

Postup HPLC analýzy

1. Kalibraci pro jednotlivé nukleotidy provádíme v rozsahu koncentrací 10 - 30 ng vždy při výměně nové kolony nebo předkolony. Ověřujeme jednobodově před každým novým setem vzorků. Smícháme zásobní (zamražené) roztoky standardů v poměru 1:1:1:1, což odpovídá výsledné koncentraci nukleotidů 25 ng/µl a naředíme 10x. Provedeme nástřik 4 µl = 10 ng každého nukleotidu.
2. Alikvóty DNA vzorků po hydrolýze (2.5 µl) rozmrazíme a přidáme 37.5µl HPLC vody. Zvortexujeme a zcentrifugujeme. Vzorky přepipetujeme k HPLC analýze do příslušných insertů.
3. Naprogramujeme analýzu příslušného setu vzorku v programu Millenium. Výsledky analýz jednotlivých vzorků jsou automaticky vypisovány a současně ukládány na hard disk. Z výsledků o koncentarci jednotlivých nukleotidů vyhodnocujeme jejich sumací koncentraci DNA ve vzorku (µg DNA), která byla vzata do postlabelingového experimentu.

11. Výpočet hladin DNA aduktů

Výpočet hladin DNA aduktů v analyzovaných vzorcích provádíme v programu Excel. Pro výsledný počet DNA aduktů - Z v daném vzorku platí vztah

$$Z\ [adukt / 10^{8}\ nukleotid] = 0.00501 \cdot \frac{A_{CPM}}{X_{\mu gDNA}}$$

Množství DNA ve vzorku X (µg DNA) vyhodnotíme z HPLC analýzy nukleotidů. Provádíme korekci CPM analyzovaných vzorků podle CPM blankových vzorků a to pro jednotlivé spoty (DNA adukty) i diagonální radioaktivní zóny.

Vypočítáme hladinu DNA aduktů B(a)P-DNA standard, který používáme při každém postlabelingovém experimentu v triplikátech pro kontrolu všech postupů. Je-li průměrná hodnota z triplikátu odchýlena od hodnoty deklarované pro standard > 15%, pak kvantitativní výsledky experimentu nepovažujeme za relevantní a hodnotíme pouze výsledky kvalitativní (mapa aduktů a jejich zastoupení v jednotlivých analyzovaných vzorcích).