

ĆWICZENIE 4

Wpływ promieniowania UV na DNA fibroblastów skóry. Przykłady antyoksydantów przeciwdziałających fotostarzeniu skóry

Celem ćwiczenia jest poznanie metod izolacji DNA z fibroblastów skóry ludzkiej oraz analizy elektroforetycznej DNA wyizolowanego z komórek poddanych naświetleniu UVA i UVB.

I. Elektroforeza DNA w żelu agarozowym.

Materiał i odczynniki:

Próbki DNA izolowane z lizatów fibroblastów

Bufor obciążający do nanoszenia próbek DNA na żel

Marker wielkocząsteczkowy wielkości DNA (125-23000 par zasad)

Marker niskocząsteczkowy wielkości DNA (100-700 par zasad)

Agaroza

Bufor TBE (Tris/kwas borowy/EDTA) pH = 8.0

Roztwór bromku etydyny (10 mg/ml)

Wykonanie:

1. Przygotowanie żelu agarozowego:

Przygotować 0,8% (w/v) roztwór agarozy w buforze TBE. Obliczyć ile g agarozy należy odważyć w celu sporządzenia 100 ml roztworu. Ogrzewać roztwór w kuchence mikrofalowej do całkowitego rozpuszczenia agarozy, nie dopuszczając do wrzenia. Odczekać lub schłodzić roztwór pod bieżącą wodą do temperatury około 60°C (naczynie można utrzymać w dłoni) i dodać 10 µl roztworu bromku etydyny. Jest to barwnik fluorescencyjny, który stosuje się do wizualizacji DNA po rozdziale elektroforetycznym; ze względu na jego właściwości mutagenne, należy pracować w rękawiczkach gumowych. Po dokładnym i szybkim wymieszaniu, roztwór agarozy wylać do sanek, włożyć grzebienie i pozostawić do polimeryzacji (co najmniej 0,5 godziny). Po polimeryzacji wyciągnąć grzebienie i zalać żel buforem TBE.

2. Naniesienie próbek na żel:

Do próbek DNA o objętości 10 µl dodać 2 µl buforu próbkowego

Próbki DNA o objętości 12 µl oraz markery cząsteczkowe (5 µl) nanosić do kolejnych studzienek uważając aby nie przebić końcówką do pipety dna żelu i nie stracić próbek.

Kolejność ich nanoszenia:

- 1) Marker wielkocząsteczkowy (125 -23000 par zasad)
- 2) DNA kontrolne (izolowane z lizatów fibroblastów nie poddanych naświetleniu UV)

- 3) DNA izolowane z lizatów fibroblastów poddanych naświetleniu UVB
- 4) DNA izolowane z lizatów fibroblastów poddanych naświetleniu UVA
- 5) Marker niskocząsteczkowy (100-700 par zasad)

Po naniesieniu próbek dopełnić aparat do elektroforezy buforem TBE tak, aby przykryć żel. Podłączyć odpowiednio kable do zasilacza (próbki DNA migrują w kierunku dodatniej anody) i prowadzić elektroforezę pod napięciem 100 V przez około 60 min. Na początku elektroforezy sprawdzić czy w odpowiednim kierunku migrują rozdzielane próbki DNA.

3. Zakończenie elektroforezy:

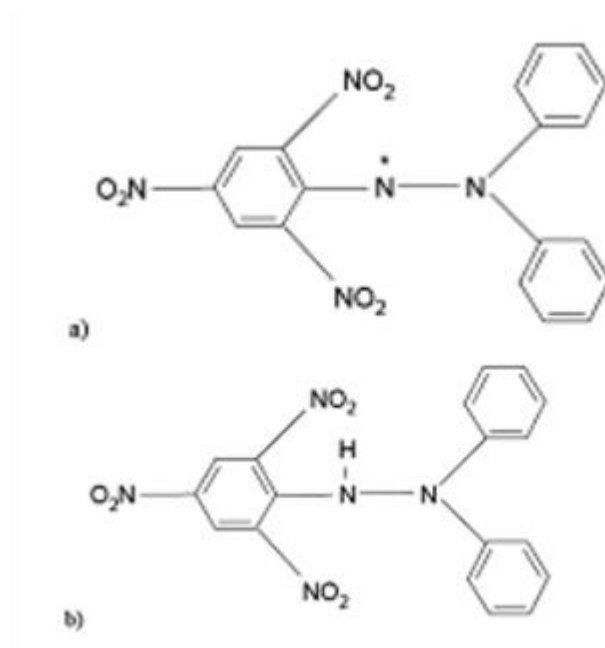
Aparat odłączyć od źródła prądu, żel opłukany w naczyniu z wodą destylowaną przenieść na transiluminator UV.

4. Opracowanie wyników:

Określić przybliżoną wielkość genomowego DNA izolowanego z komórek kontrolnych (nie poddanych naświetlaniu) i z komórek naświetlanych UVA i UVB oraz wyciągnąć odpowiednie wnioski.

II. Pomiar zdolności przeciwutleniających wybranych antyoksydantów z użyciem syntetycznego rodnika DPPH

Celem ćwiczenia jest zapoznanie z metodyką pomiaru zdolności antyoksydacyjnych wybranych preparatów i naparów z użyciem syntetycznego rodnika DPPH (1,1-difenylo-2-pikrylohydrazyl). DPPH jest stabilnym wolnym rodnikiem i ma niesparowany elektron na powłoce walencyjnej na jednym z atomów azotu tworzących mostek azotowy. Jego alkoholowy roztwór ma ciemnofioletową barwę. W reakcji z substancją, która może oddawać atom wodoru tworzy formę zredukowaną DPPH i wówczas zanika fioletowe zabarwienie roztworu. Zmianę tę można monitorować spektrofotometrycznie. Stopień zmiany barwy roztworu DPPH po dodaniu do niego roztworu zawierającego antyoksydanty jest miarą ich zdolności do zmiatania wolnych rodników.



Rys. 1. DPPH a) wolny rodnik, b) forma zredukowana

Wykonanie:

1. Przygotowanie roztworów antyoksydantów:

W celu przyrządzenia 0,5% naparów 1g (herbat, kaw i ziół) zalano 100 ml wody o temperaturze 90°C. Po upływie 8 minut napar sączono i chłodzono do temperatury pokojowej. Napary rozcieńczono wodą w stosunku 1:1.

2. Przygotowanie 0,5 mM alkoholowego roztworu rodnika DPPH.

Roztwór przygotowano rozpuszczając 19,71 mg DPPH w 100 ml etanolu. Otrzymany roztwór rozcieńczono tak, aby jego absorbancja przy długości fali $\lambda = 517$ nm wynosiła ok.1,0 (odczytywana wobec etanolu).

3. Pomiar absorbancji roztworów zawierających antyoksydantów

Do 2,5 ml roztworu DPPH rozpuszczonego w etanolu dodać 33 μ l roztworów zawierających antyoksydanty i po wymieszaniu odstawić na 15 minut. Po 15 minutach wykonać pomiar absorbancji badanych roztworów wobec próby kontrolnej (etanolu).

4. Obliczenia

Zdolność badanego antyoksydantu do przeciwdziałania reakcji utleniania obliczyć ze wzoru:

$$\% \text{ inhibicji} = 100 (A_o - A_B) / A_o$$

A_o – absorbancja rodnika DPPH

A_B – wartość absorbancji badanego roztworu zawierającego antyoksydant