

## Detekce nukleových kyselin pomocí dot-blot

Marcela Vlčnovská<sup>a</sup>, Kristýna Šmerková<sup>a</sup>, Markéta Vaculovičová<sup>a,b</sup>, Soňa Křížková<sup>a,b</sup>, René Kizek<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika

<sup>b</sup> Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické v Brně, Technická 10, 616 00 Brno, Česká republika

### Nucleic acids detection by dot-blot method

Dot-blot is one of biological methods that are normally used in research laboratories and especially in the diagnostics. It is the most commonly used method for identification and immunodetection of particular proteins which may be markers of various diseases. The main aim of the experiment was to develop a simple, inexpensive and rapid method for specific detection of nucleic acids, especially DNA, and then this procedure apply to the detection of DNA modified by platinum cytostatic drugs. Despite platinum cytostatic drugs' common use in chemotherapy of various cancer types, their biochemical effect is still not completely clear. The generally accepted opinion is that the drug binds to cellular DNA. It was observed that cisplatin is bound to the DNA the most compared to oxaliplatin and carboplatin.

**Přijato k publikování:** 21. 2. 2014

**Klíčová slova:** cytostatická léčiva; DNA; dot-blot; imunodetekce; protilátka

### Úvod

Dot-blot patří mezi jednoduché, ale důležité biologické metody, které se běžně uplatňují ve výzkumných laboratořích a především v diagnostice. Jedná se o zjednodušený northern blot, nebo Southern blot, což jsou metody, které kombinují elektroforetickou separaci a imunodetekci<sup>1,2</sup>. Při dot-blotu nemusí být prováděna gelová elektroforéza, což značí velkou časovou úsporu a hlavní výhodou této metody je možnost užití poměrně malého množství biologického vzorku. Pro detekci se využívá specifických vazeb antigen-protilátka. Nejčastěji se používá pro identifikaci a imunodetekci především proteinů, které mohou být markery nejruznějších onemocnění<sup>3</sup>, nicméně tuto metodu lze využít i pro studium nukleových kyselin. Protilátky proti DNA byly poprvé objeveny roku 1957<sup>4</sup> a jedná se o podskupinu antinukleárních protilátek, které se váží na jednořetězcovou anebo dvouřetězcovou DNA. Zpravidla jsou to IgM nebo IgG protilátky<sup>5-7</sup>. Hlavním cílem experimentu bylo vyvinout jednoduchou, časově a finančně nenáročnou metodu specifické detekce nukleových kyselin, především DNA, a následně tento postup aplikovat na detekci DNA ovlivněné platinovými cytostatickými léčivy. Cytostatika na bázi platiny jsou již desetiletí úspěšně aplikována při chemoterapiích různých typů rakoviny, ale i přesto není zcela znám jejich biochemický účinek. Dnes obecně uznávaným názorem je, že tato léčiva tvoří adukty s buněčnou DNA a následně tak narušují transkripci a replikaci DNA<sup>8,9</sup>.

### Experimentální část

#### Dot-blot DNA

Na nylonovou membránu Zeta Probe (Bio-Rad, USA) byly naneseny po 2  $\mu$ l vzorky DNA (PCR produkt, 498 bp). Po vysušení v inkubátoru při teplotě 37 °C byla membrána připravena k blokování v blokovacím pufru (10 mg/ml BSA/sušené mléko v PBS), které probíhalo 30 minut v mikrozkumavce, či falkonce (v závislosti na velikosti použité membrány) na rotátor-mixeru Multi RS-60 (Biosan, Lotyšsko) – 60 rpm. Objem byl zvolen tak, aby se roztok neustále přelíval přes membránu, aby se zabránilo jejímu vysušení. Membrána byla následně umístěna do roztoku primární protilátky [Anti-ds DNA antibody HYB331-01/ Anti-platin modified DNA antibody CP9/19; (Abcam, Anglie)] ředěné v protilátkovém pufru (1 mg/ml BSA v PBS) v objemovém poměru 1:1000. Mikrozkumavka, či falkonka byla opět umístěna po dobu 60 minut na otáčecí rotátor. Vzápětí musela být membrána 3x promyta PBS w/0,05% Tween 20 na Petriho misce, vždy po dobu 5 minut, aby se odstranily veškeré zbytky protilátky, které neinteragovaly se vzorkem DNA. Petriho miska byla umístěna na kývací třepačku (Rocking Shaker WT 12, Biometra, Německo). Objem promývacího roztoku byl zvolen v závislosti na velikosti Petriho misky tak, aby byla membrána neustále ponořena. Následně byla membrána vložena do roztoku sekundární protilátky anti-mouse Dako P 0260, ředěné v protilátkovém pufru

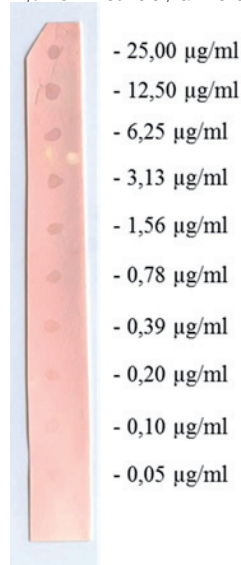
v poměru 1:1500. Byla umístěna na otáčecí třepačku po dobu 60 minut 60 rpm a poté opět 3x promyta. K substrátovému pufru (0,1 M acetátový pufr; pH 5,4) bylo přidáno AEC (3-amino-9-ethylcarbazole) v DMF (N, N Dimethylformamide) a peroxid vodíku v poměru 1000:10:1. Membrána byla do roztoku ponořena líčovou stranou se vzorky a následně otočena tak, aby bylo možné pozorovat změny. Poté, co se dostatečně výrazně objevily tečky, byla membrána opláchnuta vodou a nechána uschnout. Postup byl proveden podle Krizkova et al.<sup>10</sup>.

### Interakce DNA s cytostatiky

Roztok fragmentu DNA byl smíchán s cisplatinou, oxaliplatinou a karboplatinou o různých koncentracích, viz výsledky, vždy v poměru 1:1 (v/v) v prostředí 10 mM NaClO<sub>4</sub>. Směs DNA s cytostatiky byla poté inkubována po dobu 24 hodin při 37 °C (Thermomixer 5355, Eppendorf, Německo).

### Výsledky a diskuze

Zjištění citlivosti metody dot-blotu a její následná optimalizace byla prováděna na PCR produktu o délce 498 bp. Následně byla tato DNA inkubována v různých koncentracích tří cytostatických léčiv na bázi platinu. Konkrétně byla zvolena cisplatin, oxaliplatin a



**Obr. 1:** Koncentrační řada DNA

kteřá byla následně detekována na dot-blotovací membráně pomocí protilátky HYB 331-01. Z obrázku 1 vyplývá, že anti-ds DNA protilátka HYB 331-01 je vhodná pro dot-blot DNA. Pomocí této

protilátky. Detekce takto vytvořených komplexů byla prováděna pomocí protilátky anti-Pt DNA, která je specifická na DNA ovlivněnou platino-  
vým léčivem.

### Dot-blot DNA pomocí protilátky HYB 331-01

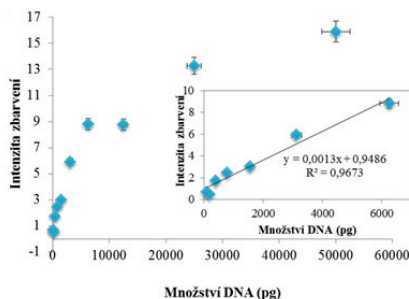
V prvním experimentu prováděném touto metodou byla vytvořena pŕleným ředěním koncentrační řada PCR fragmentu,

protilátky je možné ve vzorku detekovat i relativně malé množství DNA a to až do řádů desítek pikogramů (Tab. 1).

| Koncentrace DNA | Hmotnost DNA ve 2 µl vzorku |
|-----------------|-----------------------------|
| 25,00 µg/ml     | 50 000 pg                   |
| 12,50 µg/ml     | 25 000 pg                   |
| 6,25 µg/ml      | 12 500 pg                   |
| 3,13 µg/ml      | 6 250 pg                    |
| 1,56 µg/ml      | 3 125 pg                    |
| 0,78 µg/ml      | 1 562,5 pg                  |
| 0,39 µg/ml      | 781,25 pg                   |
| 0,20 µg/ml      | 390,63 pg                   |
| 0,10 µg/ml      | 195,31 pg                   |
| 0,05 µg/ml      | 97,66 pg                    |

**Tab. 1:** Přepočet koncentrace na hmotnost DNA ve 2 µl vzorku

Intenzita zbarvení spotů je závislá na koncentraci DNA ve vzorku. Se snižujícím se množstvím DNA se snižuje i intenzita zbarvení, což potvrzuje Graf 1. Intenzita zbarvení spotů byla vyhodnocena pomocí Carestream molecular imaging softwaru (Carestream Health, USA).



**Graf 1:** Závislost intenzity zbarvení spotu na množství DNA (inset – lineární úsek křivky)

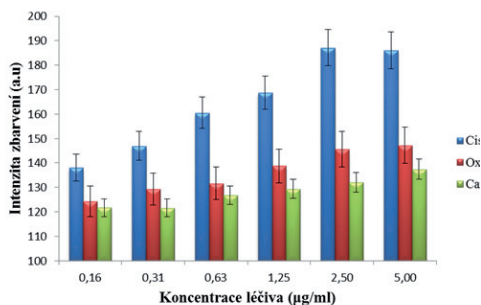


**Obr. 2:** Intenzita zbarvení blotovací membrány v závislosti na délce blokování a použitým blokovacím roztoku

### Optimalizace blokovacího roztoku

Z důvodu velmi tmavého zbarvení pozadí membrány, ke kterému došlo v předchozím experimentu, byla provedena optimalizace postupu. Jednalo se o změnu složení blokovacího roztoku. Místo BSA byl použit 1% roztok sušeného mléka a současně byl zkoumán i vliv délky blokování na následnou míru zbarvení membrány. Byly zvoleny dva časové intervaly 0,5 a 2 hodiny.

obrázku 3 lze vidět dot-blot aduktů DNA s třemi platinovými cytostatickými léčivými o různých koncentracích. Z výsledků plyne, že intenzita jednotlivých spotů neklesá pouze s koncentrací použitého platinového léčiva, ale liší se i u stejných koncentrací různých cytostatik. U cisplatinu byla detekována nejvyšší, zatímco u karboplatinu nejnižší intenzita zbarvení spotu, což opět potvrzuje i graf 2. Z toho vyplývá, že se za stejných podmínek váže nejlépe do DNA cisplatin, dále oxaliplatin a nejméně karboplatin.

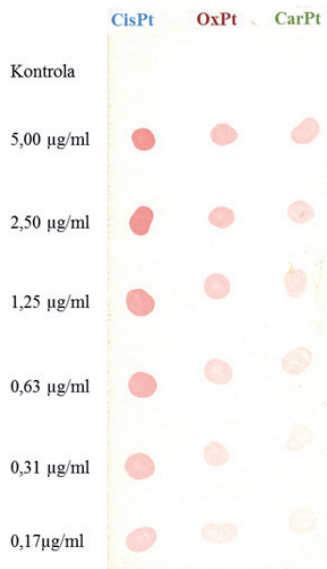


**Graf 2:** Závislost intenzity zbarvení spotu na množství a druhu aplikovaného cytostatického léčiva

Z výsledků plyne, že u BSA je zásadní doba, po kterou blotování probíhá, zatímco u roztoku sušeného mléka byl rozdíl v sytosti membrány nepatrný. Pro další pokus byl tedy, jako optimální blokovací roztok, vybrán 1% roztok sušeného mléka a vhodný čas blokování 30 minut. Celá optimalizace byla prováděna na PCR produktu o délce 498 bp a koncentraci 12,5 µg/ml.

### Dot-blot platinovaných fragmentů DNA

Následně byl experiment proveden i na platinovaných fragmentech DNA pomocí protilátky specifické na DNA ovlivněnou platinovým cytostatickem. Na



**Obr. 3:** Dot-blot platinových aduktů DNA

## Závěr

Bylo zjištěno, že metoda dot-blot je velmi vhodná pro specifickou detekci nukleových kyselin pomocí protilátky proti DNA, jako například k detekci platinových aduktů DNA pomocí protilátky anti-Pt, která specificky reaguje s DNA ovlivněnou právě cytostatickými léčivy na bázi platiny. Dot-blot se tedy jeví jako velmi spolehlivá a poměrně rychlá metoda pro identifikaci přítomnosti navázaného platinového léčiva ve struktuře DNA. I přesto, že se nejedná o kvantifikační, ale pouze o detekční metodu, z výsledků vyplývá, že se do DNA za daných podmínek váže nejvíce cisplatina, méně oxaliplatina a nejméně karboplatina. To potvrzuje obecně uznávaný fakt, že z těchto tří platinových cytostatik je karboplatina pro člověka a jeho DNA nejméně toxická.

*Autoři děkují za finanční podporu projektu CEITEC CZ.1.05/1.1.00/02.0068.*

## Literatura

1. Scitable by nature education; Northern blot; [online]. [cit. 2014-01-20] Dostupné z: <http://www.nature.com/scitable/definition/northern-blot-287>.
2. Scitable by nature education; Southern blot; [online]. [cit. 2014-01-20] Dostupné z: <http://www.nature.com/scitable/definition/southern-blot-289>.
3. Dot Blot Analysis; Teacher's Guidebook; [online]. [cit. 2014-01-20] Dostupné z: [http://www.gbiosciences.com/PDF/Protocol/502\\_Dot\\_Blot\\_Analysis\\_TEACHER.pdf](http://www.gbiosciences.com/PDF/Protocol/502_Dot_Blot_Analysis_TEACHER.pdf).
4. Ceppellini R., Polli E., Celada F.: Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 96, 572 (1957).
5. Rothfiel.Nf, Stollar B. D.: Journal of Clinical Investigation, 46, 1785 (1967).
6. Schur P. H., Sandson J.: New England Journal of Medicine, 278, 533 (1968).
7. Tojo T, Friou G. J.: Science, 161, 904 (1968).
8. Fuertes M. A., Castilla J., Alonso C., Perez J. M.: Curr. Med. Chem., 10, 257 (2003).
9. Wang D., Lippard S. J.: Nat. Rev. Drug Discov., 4, 307 (2005).
10. Krizkova S., Adam V., Eckschlager T., Kizek R.: Electrophoresis, 30, 3726 (2009).



Článek je volně šiřitelný pod licencí Creative Commons (BY-NC-ND).

Musí však být uveden autor a dokument nelze měnit a používat pro komerční účely.