

Petr MICHÁLEK^{1,2}, Jan ZÍTKA^{1,2}, Zbyněk HEGER^{1,2}, Ondřej ZÁVODSKÝ³,
Jakub KAPUŠ³ a René KIZEK^{1,2}

¹Laboratoř metalomiky a nanotechnologií, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, CZ-613 00 Brno, Česká republika, Evropská unie

²Středoevropský technologický institut, VUT v Brně, Technická 3058/10, CZ-616 00 Brno, Česká republika, Evropská unie

³Slovenská organizácia pre vesmírne aktivity, Čukárska Paka 562, SK - Veľká Paka 930 51, Slovenská republika, Evropská unie

Abstrakt

Ultrafialové záření (UV) záření může způsobit několik typů poškození nukleových kyselin - fotochemickou modifikaci, zesíťování a oxidativní poškození. Cílem práce bylo porovnat vliv UV záření za laboratorních podmínek s podmínkami ve stratosféře na RNA chřipkového viru.

Chřipkový virus H7N7

Viry způsobující chřipku spadají do oddělení *Orthomyxoviridae*. Virové částice dosahují velikosti 80 až 120 nanometrů v průměru a nejčastěji vytváří sférické útvary. Ty jsou tvořeny virovým obalem, obsahujícím na svém povrchu dva hlavní typy glykoproteinů. Uvnitř částic se nachází jednovláknová RNA obalená bílkoviny, které ji chrání. Virová RNA je rozdělena do osmi segmentů, které nesou 11 genů pro stejný počet proteinů.

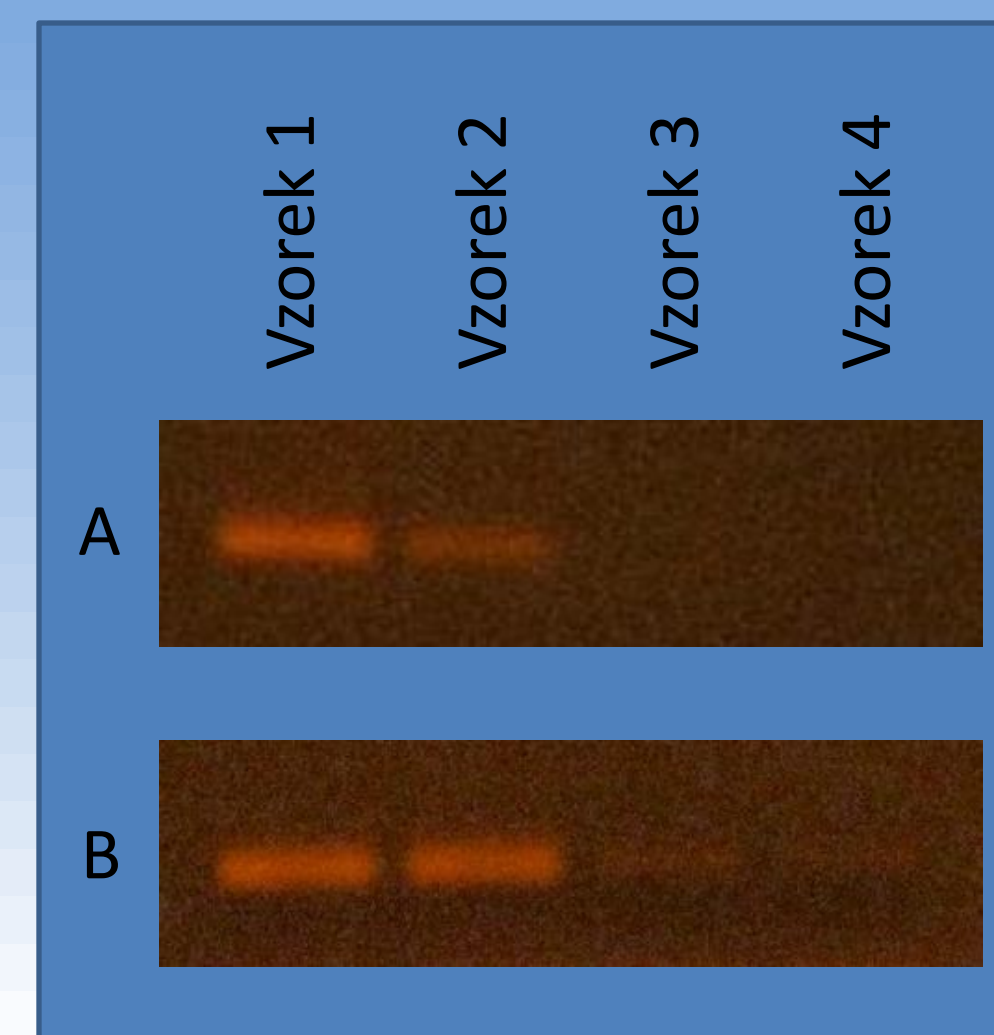
Vliv UV záření na virové nukleové kyseliny

UV záření, pocházející ze slunečního světla, působí jako hlavní přírodní virocidní složka v životním prostředí. Záření zabíjí viry chemickou modifikací jejich genetického materiálu, tedy DNA a RNA. Nejúčinnější vlnová délka pro inaktivaci, pohybující se okolo 260 nm, spadá do rozsahu UVC. Nukleové kyseliny mohou být poškozeny i UVB a UVA zářením, ale s nižší účinností než za přítomnosti UVC záření.

Nukleová kyselina v rámci virové částice hraje klíčovou úlohu při absorpci UV záření a při následné inaktivaci viru. V tomto směru je také důležitý počet bází nukleové kyseliny, kdy delší struktura zvyšuje pravděpodobnost poškození genomu. Také přítomnost dvouvláknové DNA nebo RNA snižuje negativní dopad UV záření oproti jednovláknové struktuře, vzhledem k možnosti využití reparačních mechanismů. Ostatní složky virových částic hrají menší roli v jejich inaktivaci pomocí UV záření a k jejich poškození dochází až při velmi vysokých dávkách.

Materiály a metody

100 µl vzorku chřipkového viru H7N7 bylo rozděleno do kyvet a lyofilizováno. Kyvety byly poté zataveny. Následně byly vzorky rozděleny do čtyř skupin, kdy v první skupině se nacházely vzorky, u kterých nedošlo k žádné interakci s UV zářením. Vzorky 2. skupiny byly podrobeny záření pomocí transluminátoru při vlnové délce 254 nm po dobu 60 minut. Třetí skupina byla umístěna dovnitř stratosférické sondy a čtvrtá na povrchu samotné sondy. Vzorky jednotlivých skupin byly zpracovány obdobným způsobem, kdy po otevření kyvet bylo k lyofilizátům přidáno 500 µl PBS. Z rozsuspendovaných vzorků byla odebrána část, ze které byla izolována RNA. Ta byla poté převedena na cDNA, která byla použita pro amplifikaci fragmentu *PB2* genu o délce 353 bp. Teplotní podmínky annealingu primerů byly zvoleny jak standardně při 56 °C, tak i při snížené teplotě 50 °C. Vzniklé amplikony byly poté separovány na agarózovém gelu a vizualizovány pomocí ethidium bromidu.



Obr.1 Intenzita bandů *PB2* genu

Výsledky

Z Obr.1 je zřejmé, že u vzorků 3 a 4, které byly uvnitř, resp. na povrchu sondy, došlo k výraznému poškození jejich genetického materiálu, které znemožnilo jeho amplifikaci za použití standardních podmínek (Obr.1 A) pro vazbu primerů specifických pro *PB2* genu viru H7N7. Za použití teploty annealingu 50 °C (Obr.1 B) došlo díky snížené stringenci primerů, tedy jejich přisednutí i k ne zcela komplementární sekvenci, také k amplifikaci u 3. a 4. vzorku. Vzorek 1 v tomto případě sehrává roli pozitivní kontroly. Vzorek 2, který byl podroben UV záření za laboratorních podmínek (254 nm), byl pomocí PCR metody úspěšně detekován za obou podmínek a toto záření tedy nepůsobí na virovou nukleovou kyselinu stejnou měrou jako záření stratosférické. Nicméně jeho intenzita nedosahuje za standardních podmínek hodnot jako u vzorku 1 a vystavení UV záření za laboratorních podmínek (254 nm) tedy intaktnost virové RNA do jisté míry také ovlivňuje.

Závěr

Jak laboratorní UV záření, tak i záření stratosférické, je schopno poškodit strukturu virové nukleové kyseliny a znemožnit tak její úspěšné začlenění do genomu hostitele a následné pomnožení a šíření.

Poděkování: SPOLEČNĚ PRO VÝZKUM, ROZVOJ A INOVACE CZ/FMP.17A/0436