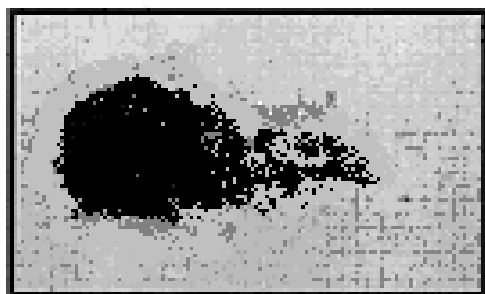


KOMET TEST
U MOLEKULARNOJ
DIJAGNOSTICI

Komet test – elektroforeza DNK pojedinačnih ćelija





ćelije

gelovi

bojenje

liza

neutralizacija

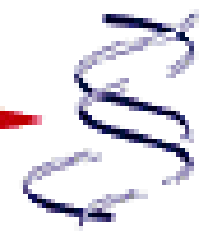
denaturacija DNK
(pH preko 13, vreme ?)

elektroforeza
(V/cm ?, mA ?, pH preko 13)

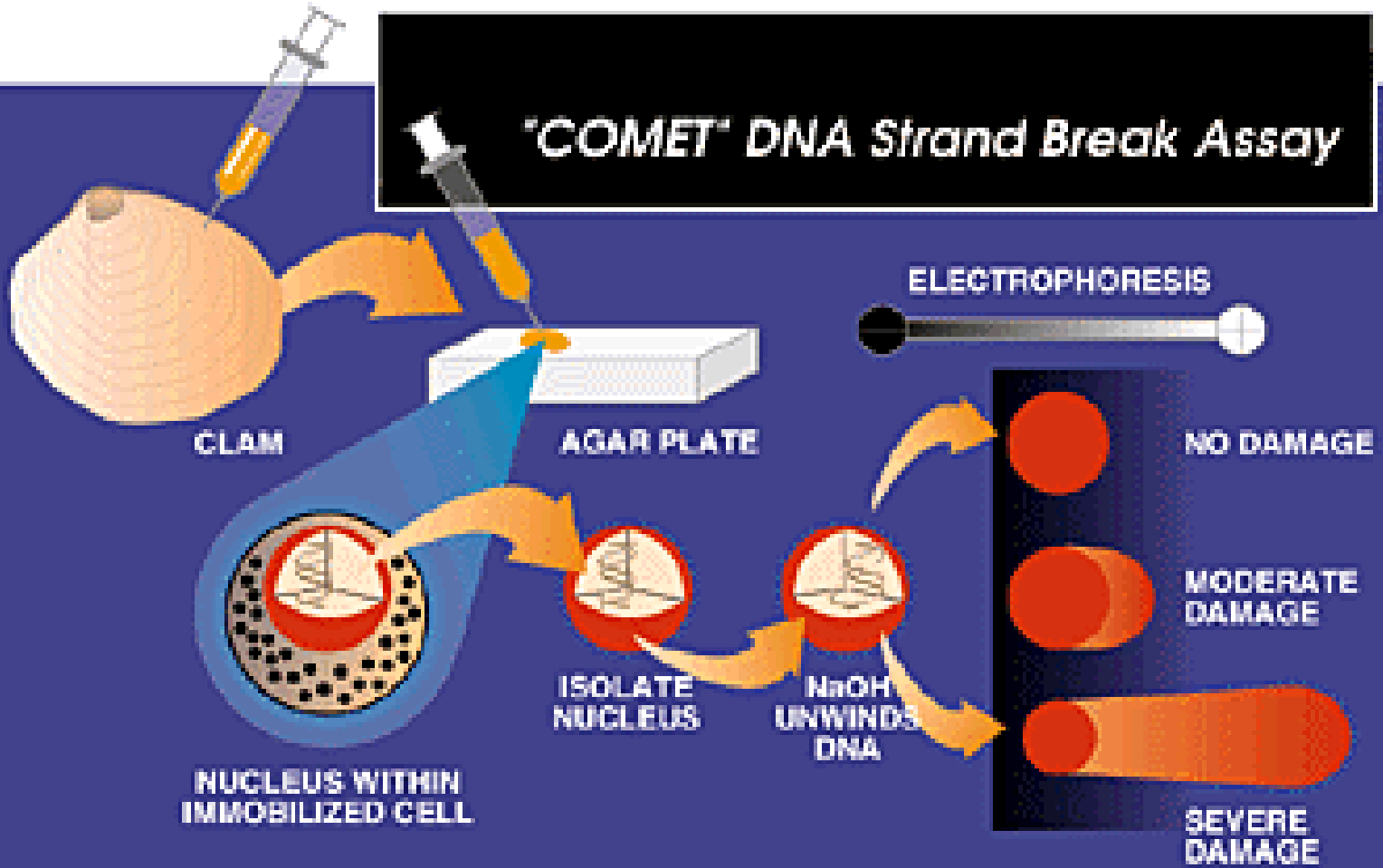


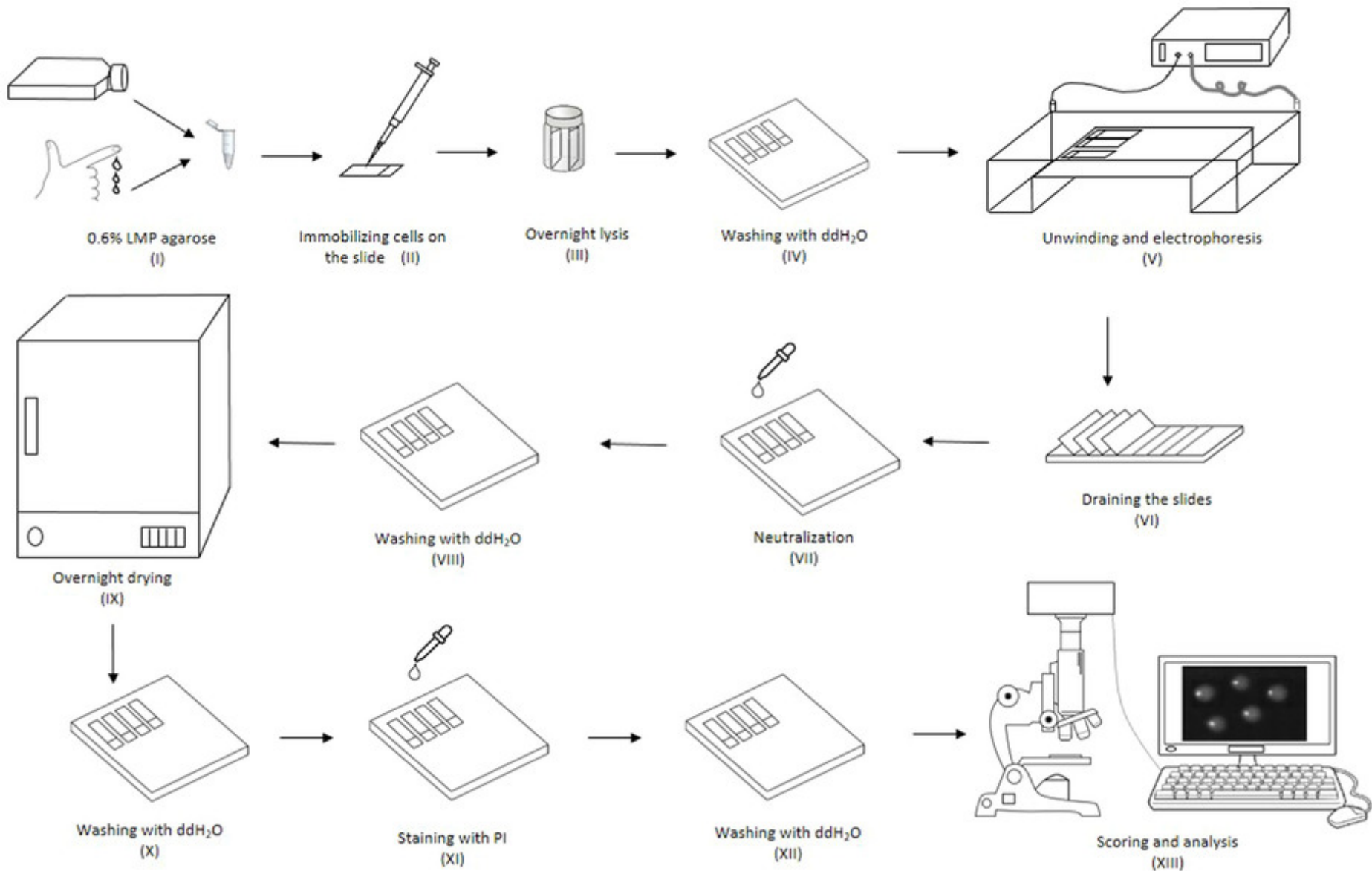


POLLUTION FRAGMENTS DNA



"COMET" DNA Strand Break Assay





Osnovne prednosti komet testa :

- visoka osetljivost
- dovoljan je mali broj ćelija za analizu
- fleksibilnost
- relativno niska cena
- dovoljne su male količine testirane supstance
- rezultati su gotovi za par dana
- široka mogućnost primene



Pravljenje rastvora za komet test

Podešavanje pH



Rastvori koji se koriste u komet testu:

- 1% agaroza
- 0,5% LMPA (low melting point agarose)
- 1% LMPA

Lizirajući rastvor (500 mL stock):

2,5 M NaCl	73 g
100 mM EDTA	18,6 g
10 mM Tris	0,16 g

Rastvoriti u 350-400 mL dH₂O i zatim napraviti 500 mL
pH podesiti na 10 sa 2-3 granulice NaOH

Finalni rastvor za liziranje:

178 mL lizirajućeg rastvora

20 mL DMSO

2 mL Triton X-100

Držati na ledu 1 h pre liziranja uzoraka

Pufer za elektroforezu (ohlađeni stock rastvor)

(300 mM NaOH/1mM EDTA

stock rastvori za ovaj pufer:

a) 10 M NaOH (80 g u 200 mL dH₂O)

b) 200 mM EDTA (7.45 g na 100 mL dH₂O, pH 10 podesiti sa NaOH)

Svež pufer za elektroforezu:

dH₂O 1930 mL

10M NaOH 60 mL

EDTA 10 mL, pH će biti oko 13,5 (bez podešavanja)

Pufer za neutralizaciju

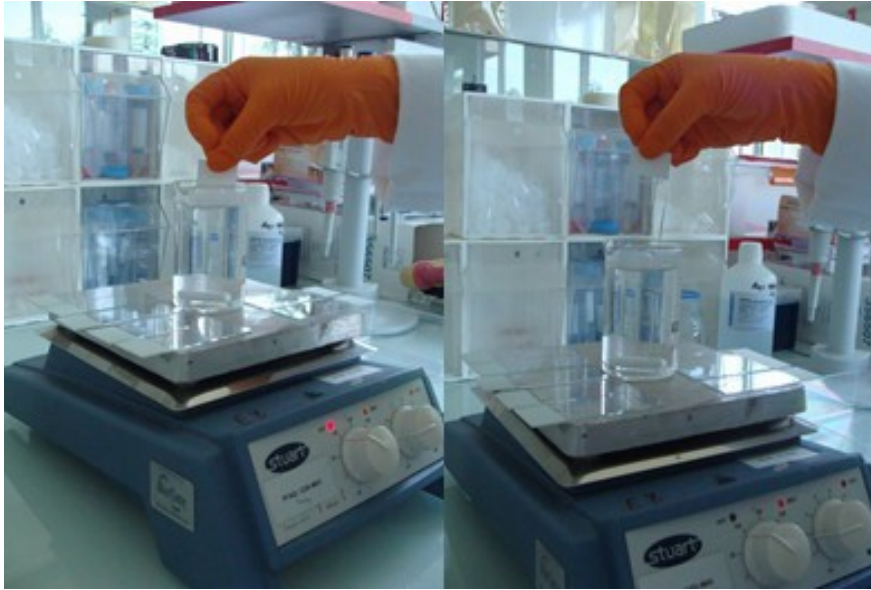
Tris 9,7 g, do 250 mL dH₂O, podesiti pH 7,5 pomoću conc. HCl

Etidijum bromid (10× stock, 10 mg/mL)

10 mg u 1 mL dH₂O, čuvati na sobnoj temperaturi

Za radni rastvor: 2 μL 10× stock-a + 998 μL dH₂O.

Pri bojenju uzeti 60-80 μL radnog rastvora po jednom predmetnom staklu.



**Nanošenje agaroze
na predmetna stakla**





Tretman uzoraka

- zavisi od jačine i vremena poluživota suspektog mutagena.
- obično je dovoljno 30 min na 37°C
- ako je slab mutagen onda se povećava njegova koncentracija ili se produži tretman.
- nakon tretmana se mora da proveri citotoksičnost, npr. pomoću boje tripan plavo. Toleriše se citotoksičnost do 30%.

DOZA = koncentracija × vreme

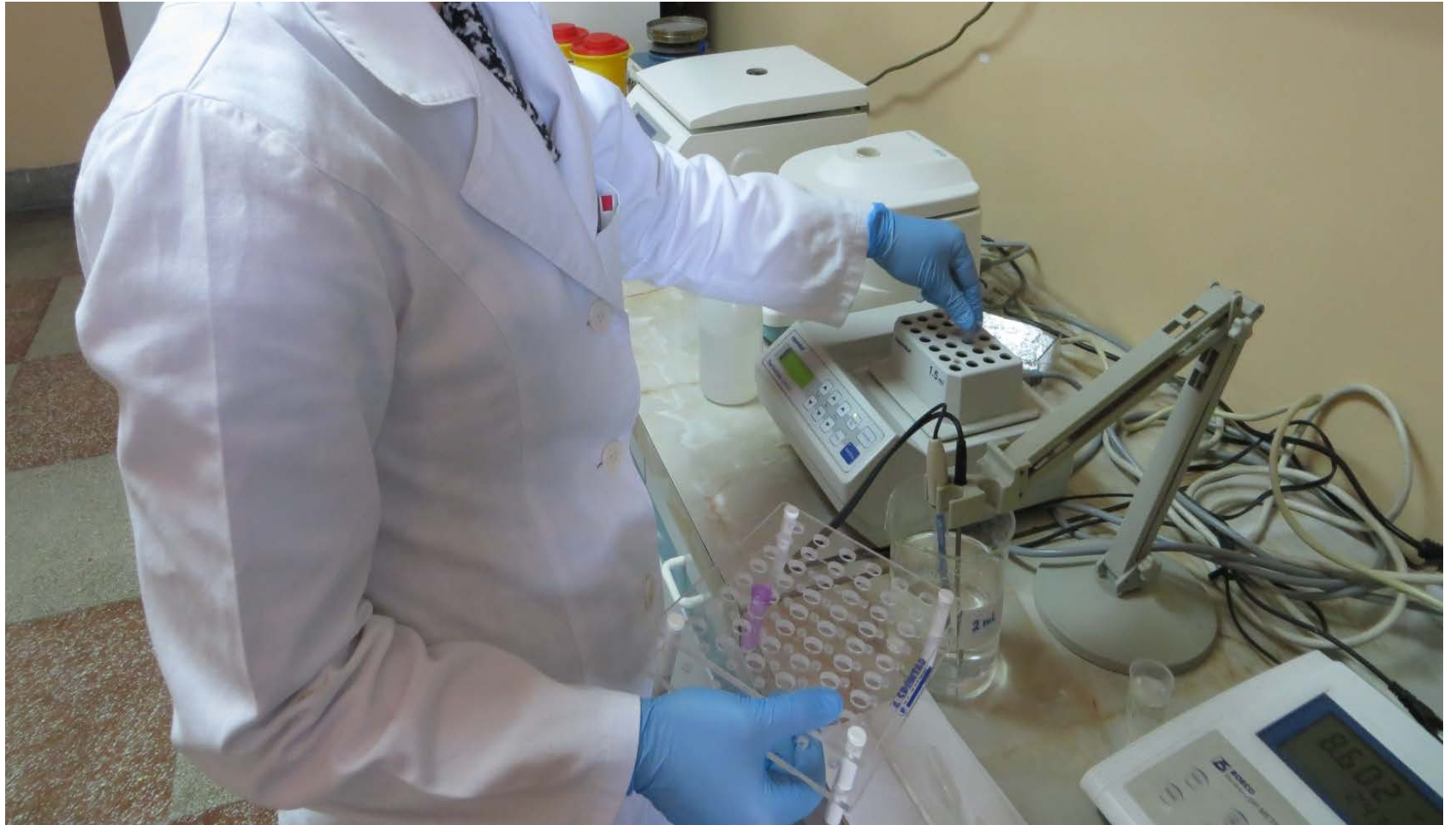


Inkubacija na odgovarajućoj temperaturi u suvom termostatu



...ili termo bloku







Centrifugiranje, 5 min na 2000 rpm









Odlivanje supernatanta i dodavanje LMPA



Nanošenje ćelija sa agarozom na predmetna stakla



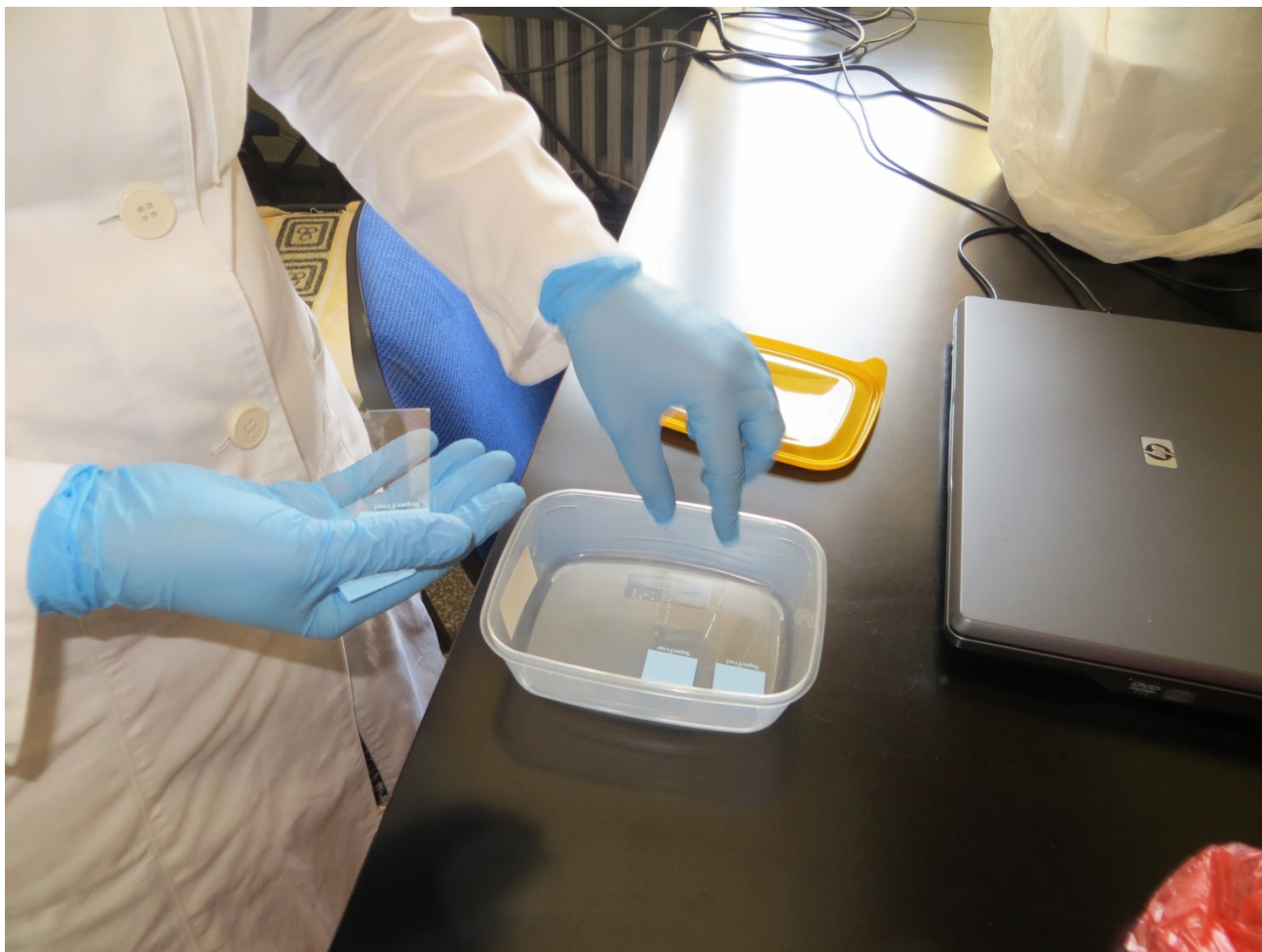


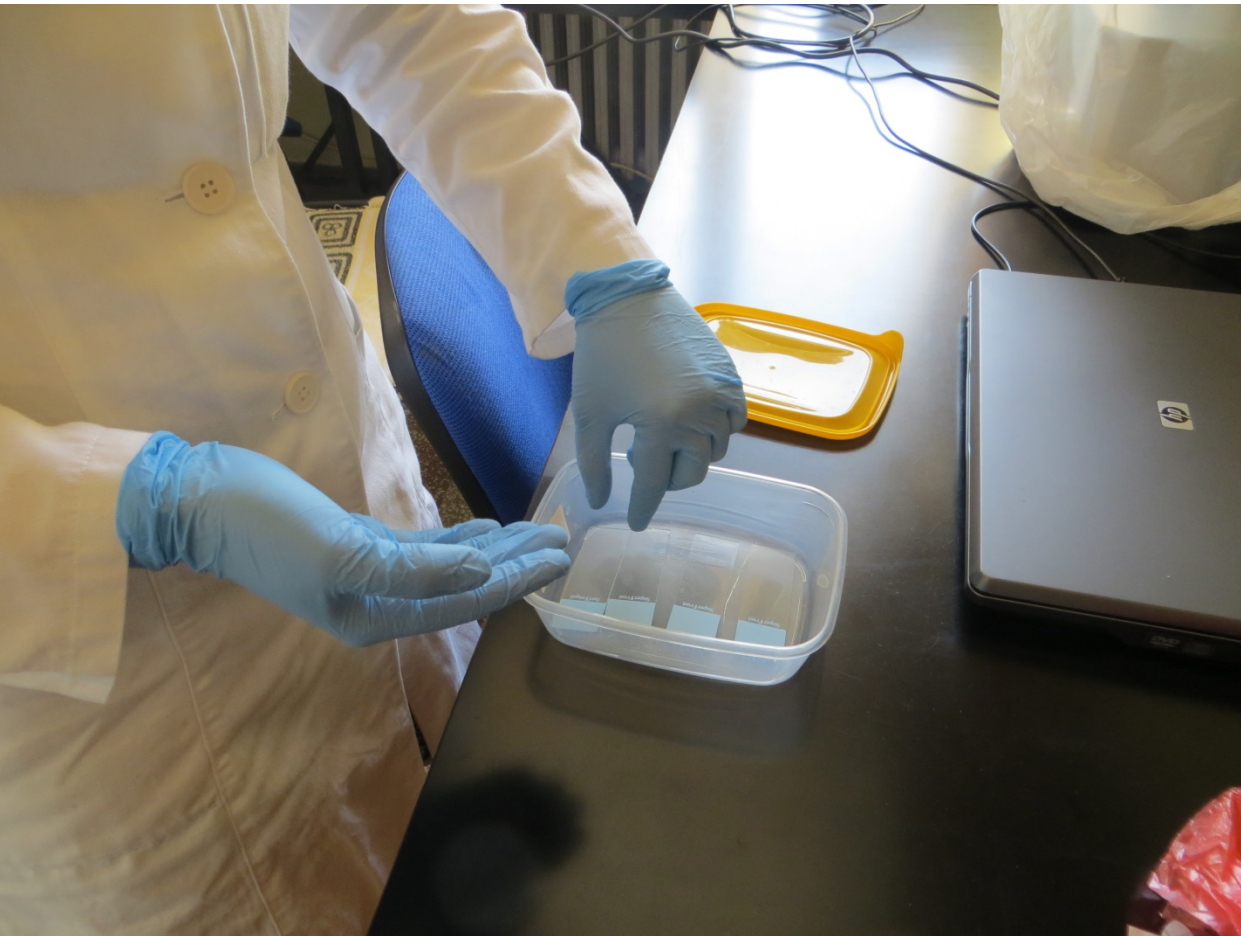
Priprema gelova

- obično se koristi tzv. sendvič tehnika (tri sloja agaroze)
- bitna je koncentracija agaroze da bi se dobila optimalna migracija oštećene DNK
- gustina ćelija u gelu mora da bude dovoljna za analizu, ali ne prevelika (preklapanje kometa nije poželjno)



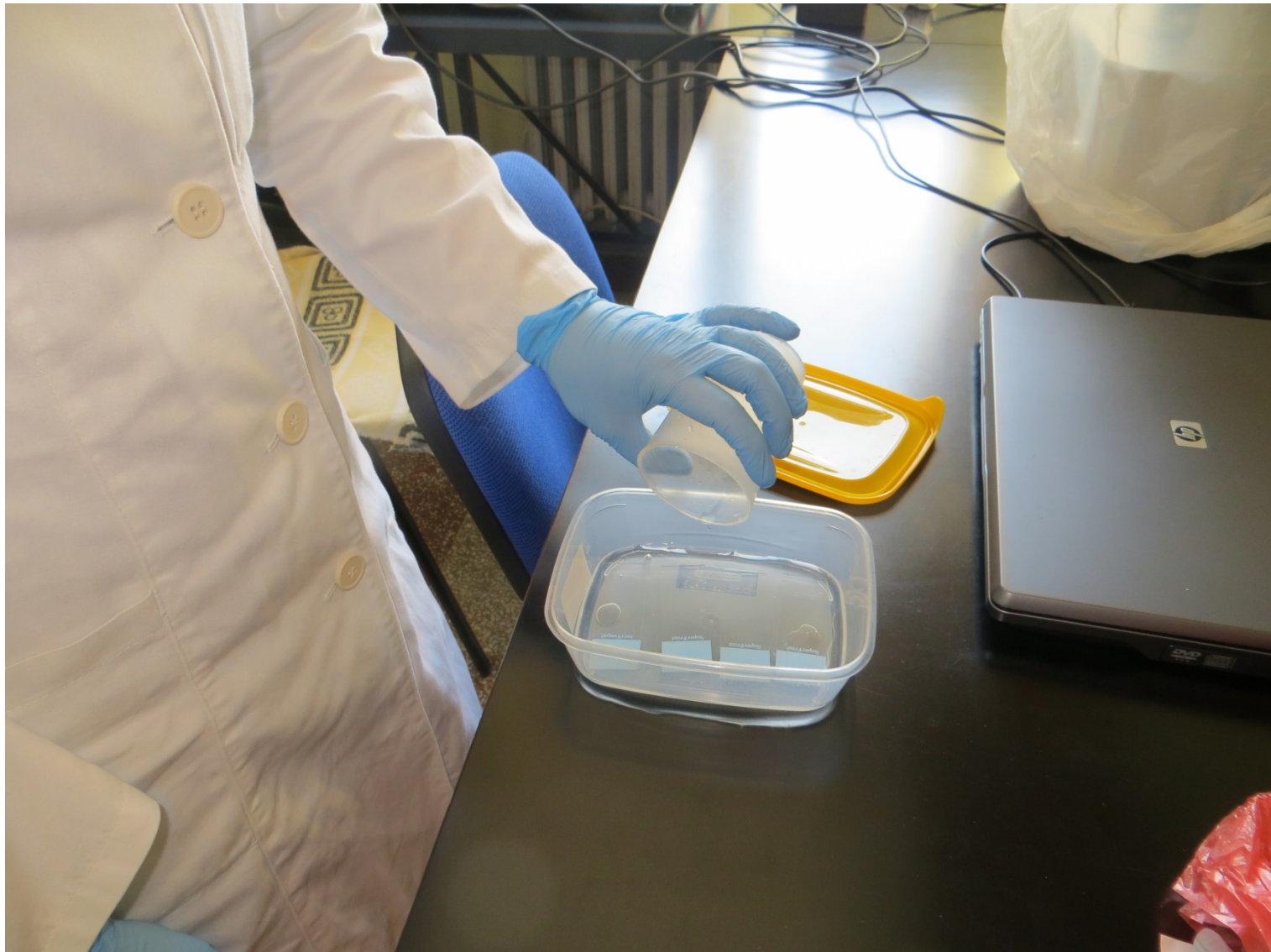
Stavljanje u lizirajući rastvor





Liza ćelija

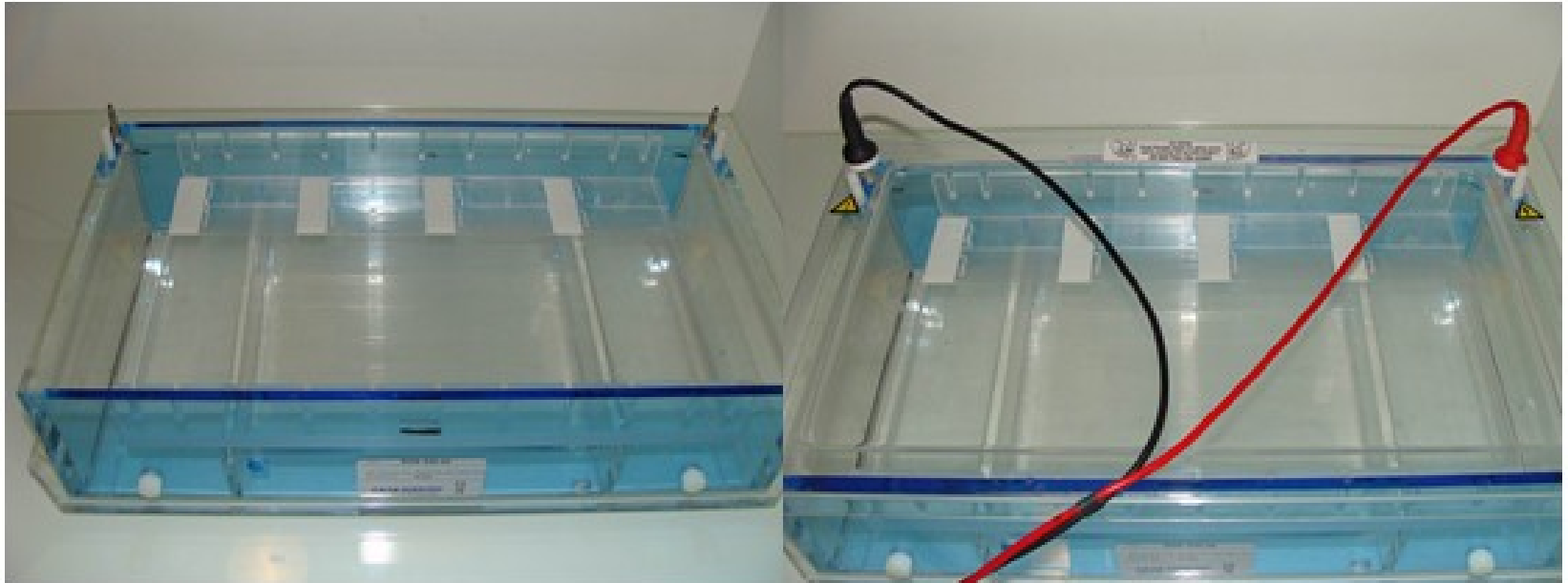
- dovodi do razaranja bioloških membrana i oslobađanja DNK od histona
- visoka conc. soli i deterdžent (najčešće Triton X-100) dovoljno su efikasni za lizu
- DMSO se dodaje da spreči oštećenja DNK od oksidativnih radikala

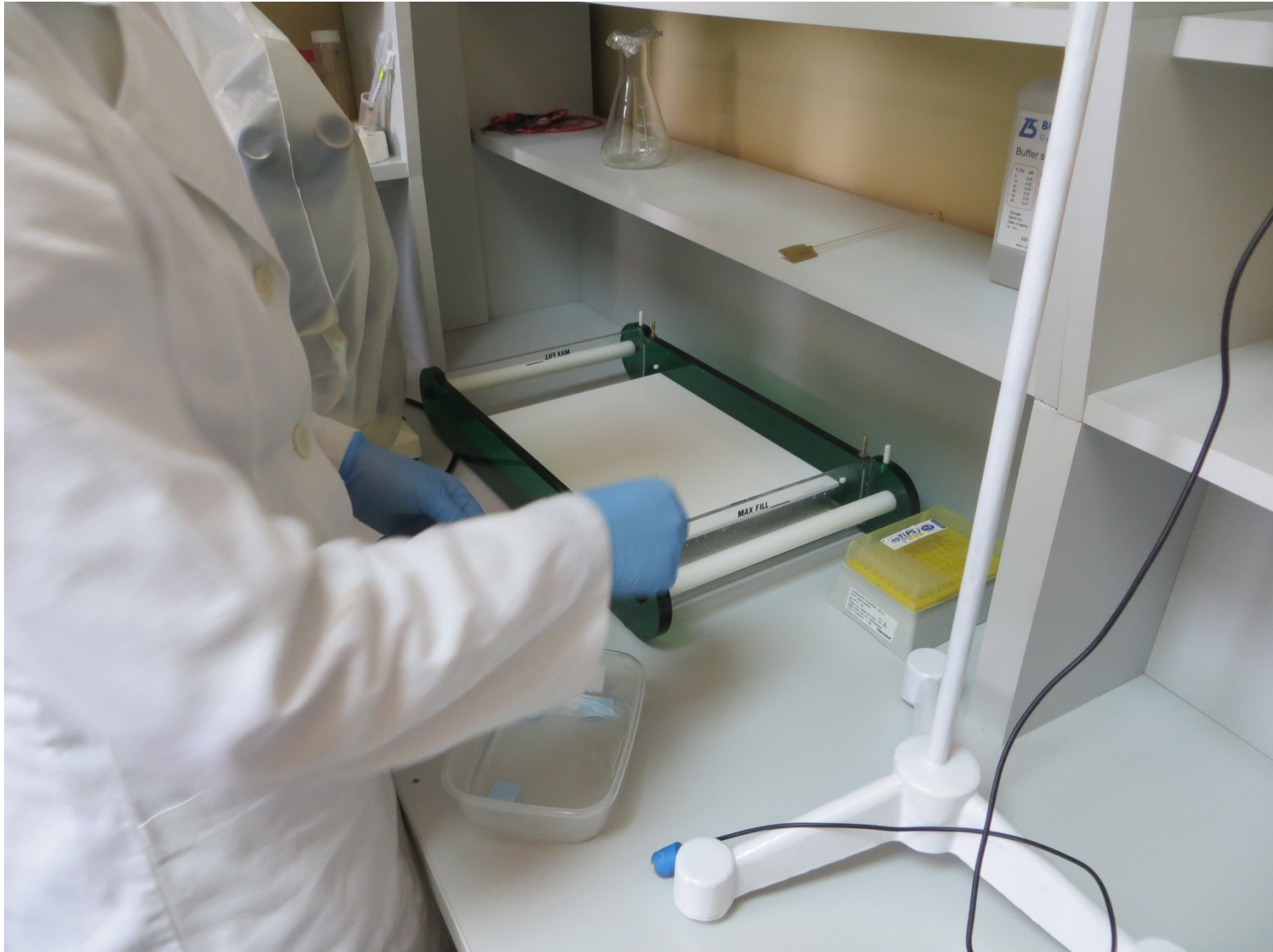


Liza preko noći na +4°C

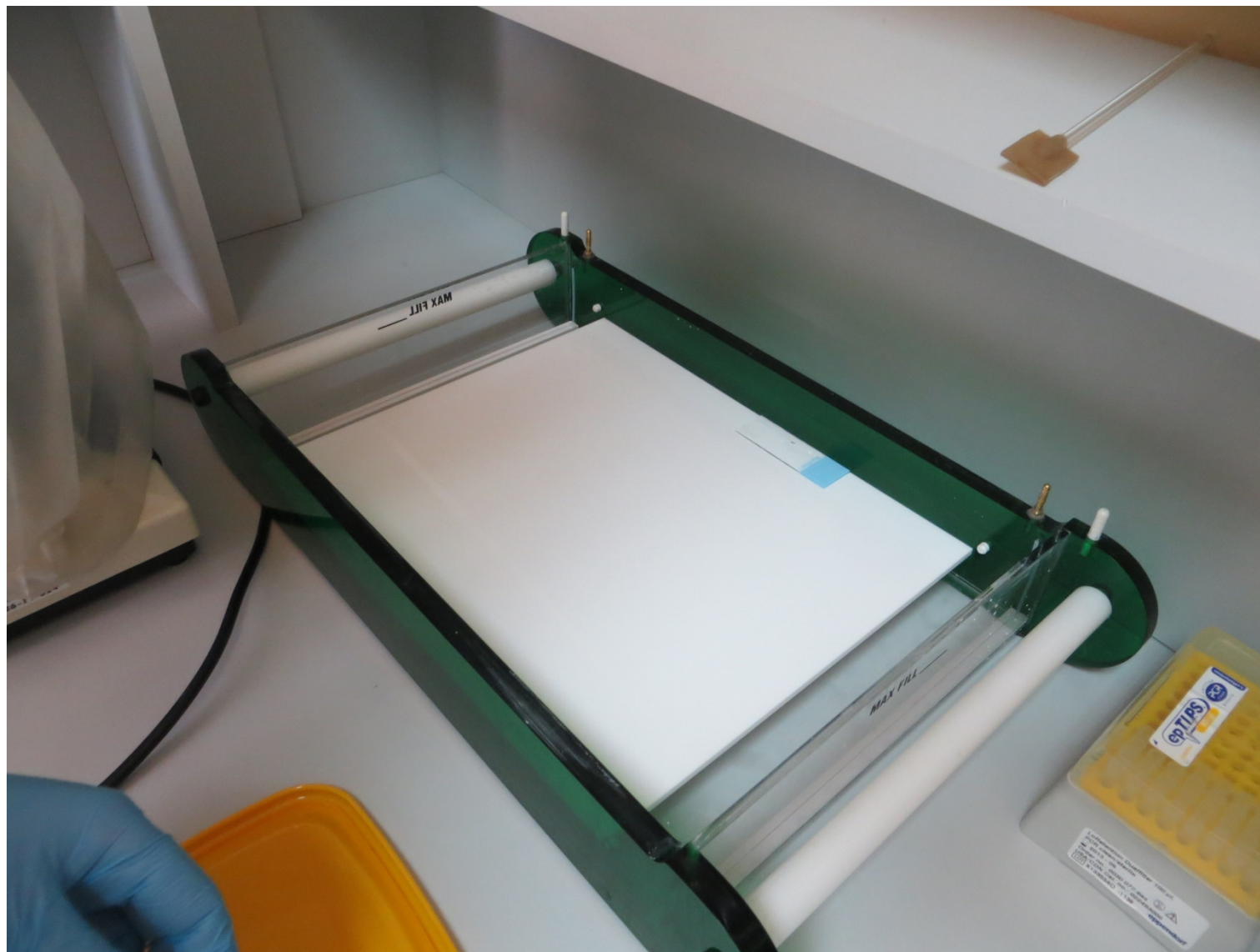


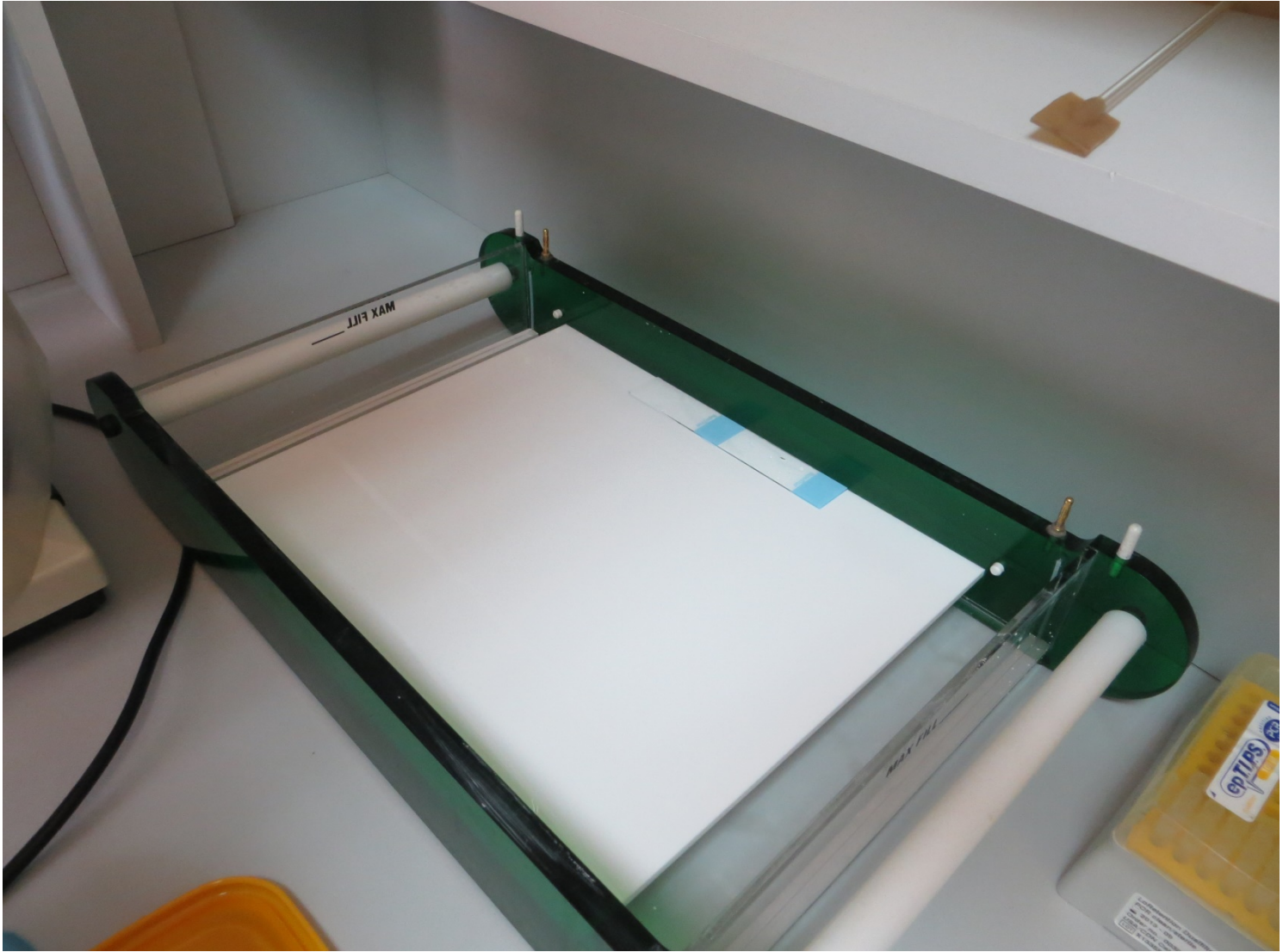
Kadica za elektroforezu

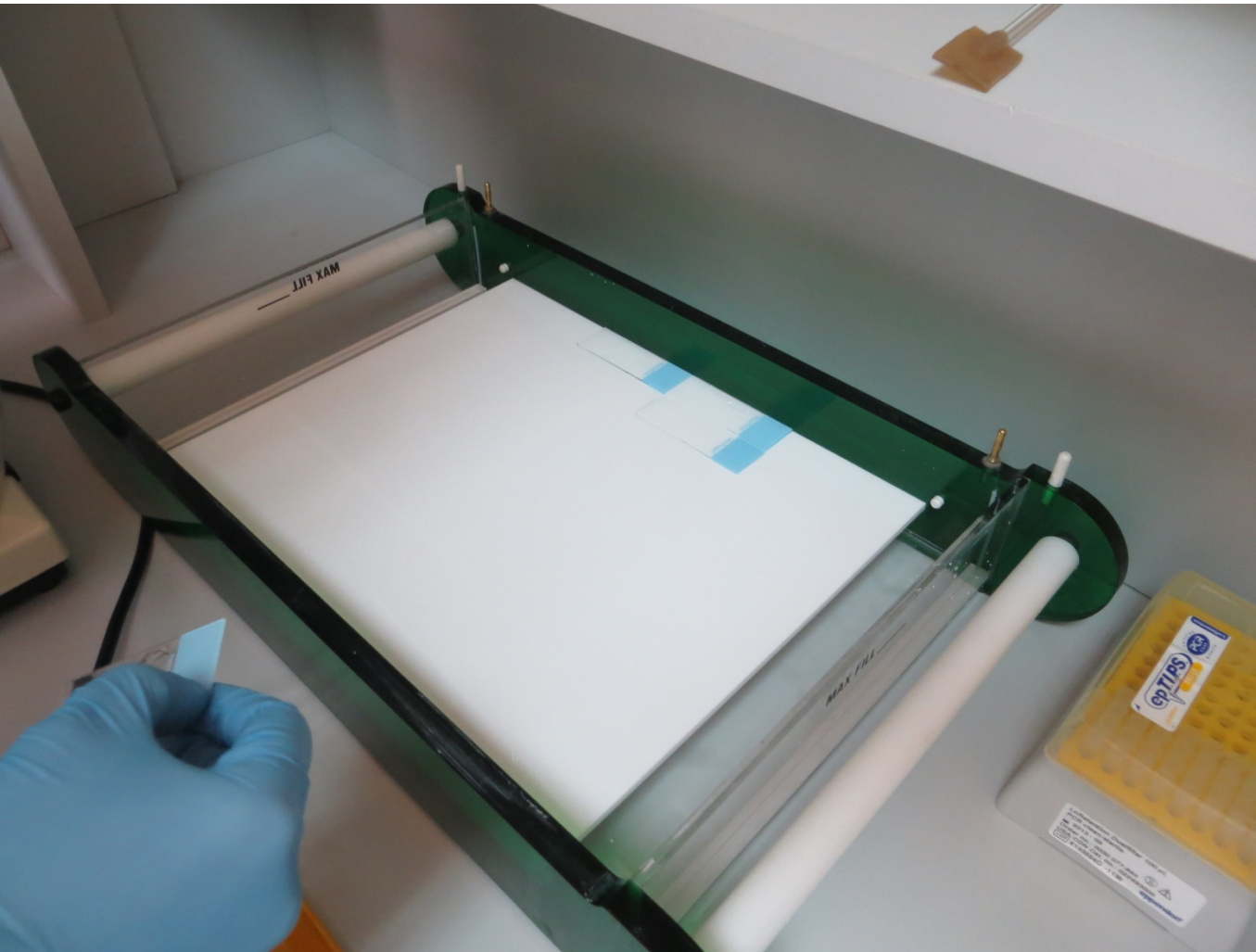




Stavljanje preparata u kadicu za elektroforezu







Denaturacija DNK

- izvodi se u istom puferu ($\text{pH} > 13$) koji će se nakon toga upotrebiti za elektroforezu

- obično 30 min.
zavisno od tipa ćelija
može i duže ili kraće

Prekrivanje kadice radi zaštite od UV svetlosti



Elektroforeza se obavlja najčešće na 25 V i 300 mA, tj. pri niskom naponu struje u trajanju od 30 min. (kratko vreme), cilj je da se obavi nekompletna migracija DNK radi lakšeg očitavanja kometa.



Neutralizacija alkalija, 3 × 5 min.

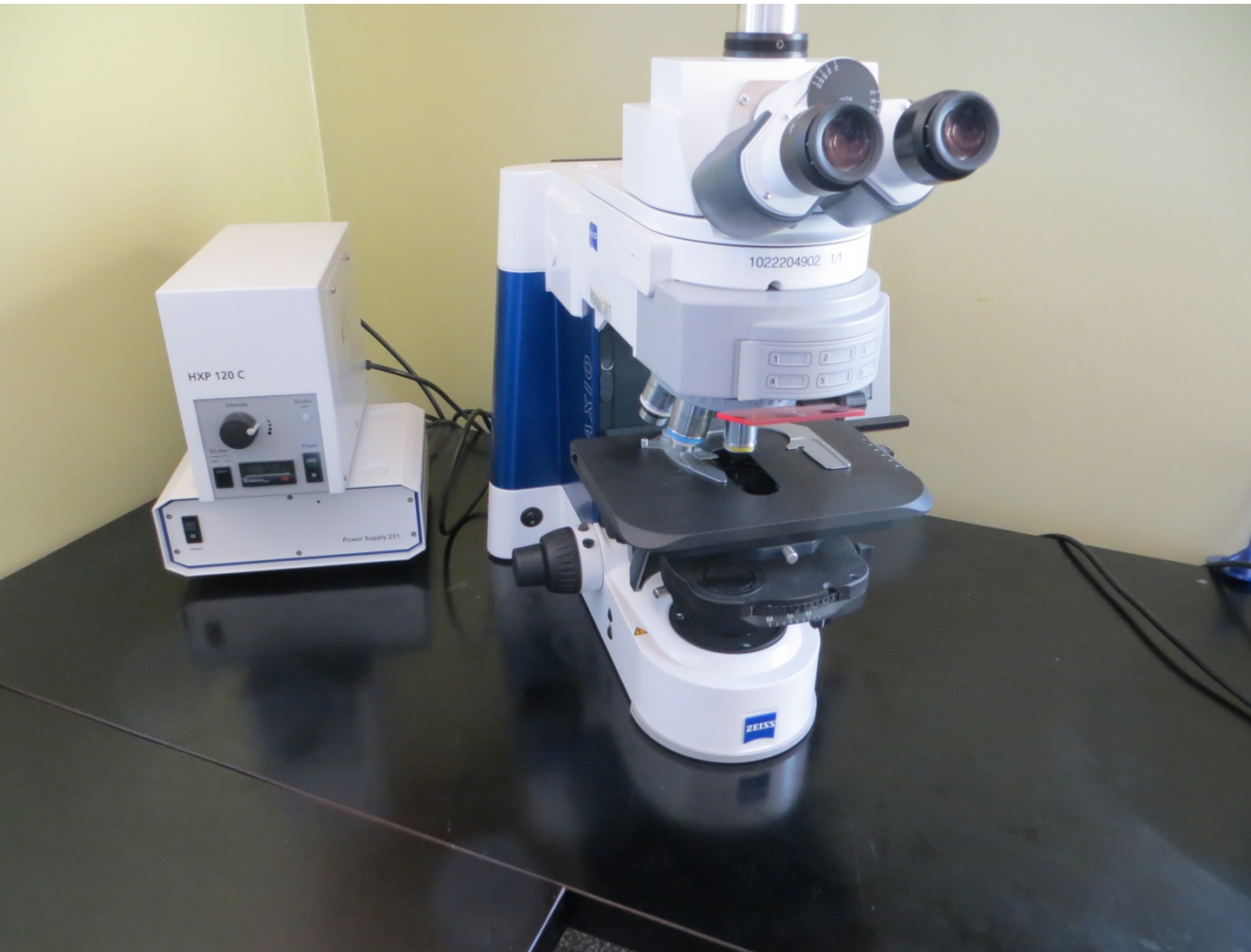


- Obavlja se puferom sa pH 7,5

- nakon neutralizacije gelovi mogu odmah da se oboje i očitavaju

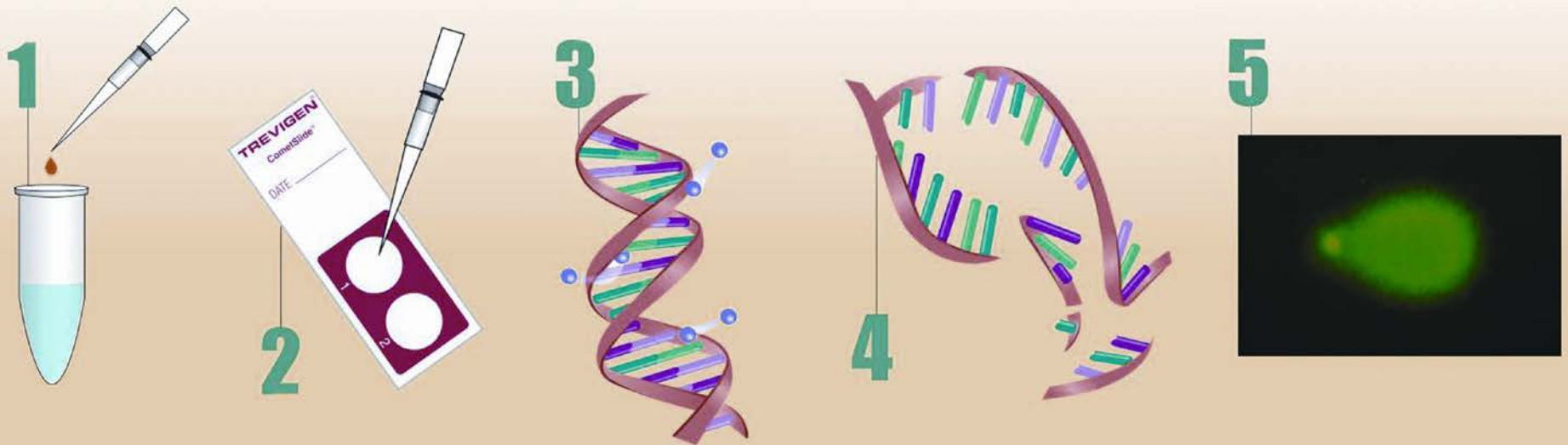
- alternativno, moguće je da se osuše i čuvaju mesecima pre očitavanja

Bojenje i posmatranje pod fluorescentnim mikroskopom



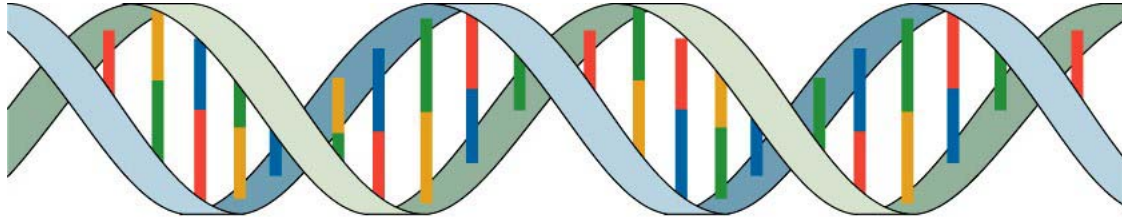
- Bojenje gelova se vrši nekom fluorescentnom bojom (najčešće je to etidijum-bromid)
- koriste se još i propidijum jodid, DAPI, SYBR zeleno, YOYO-1, akridin oranž isl.
- ima pokušaja nefluorescentnog bojenja npr sa AgNO_3 .

KORACI U KOMET TESTU

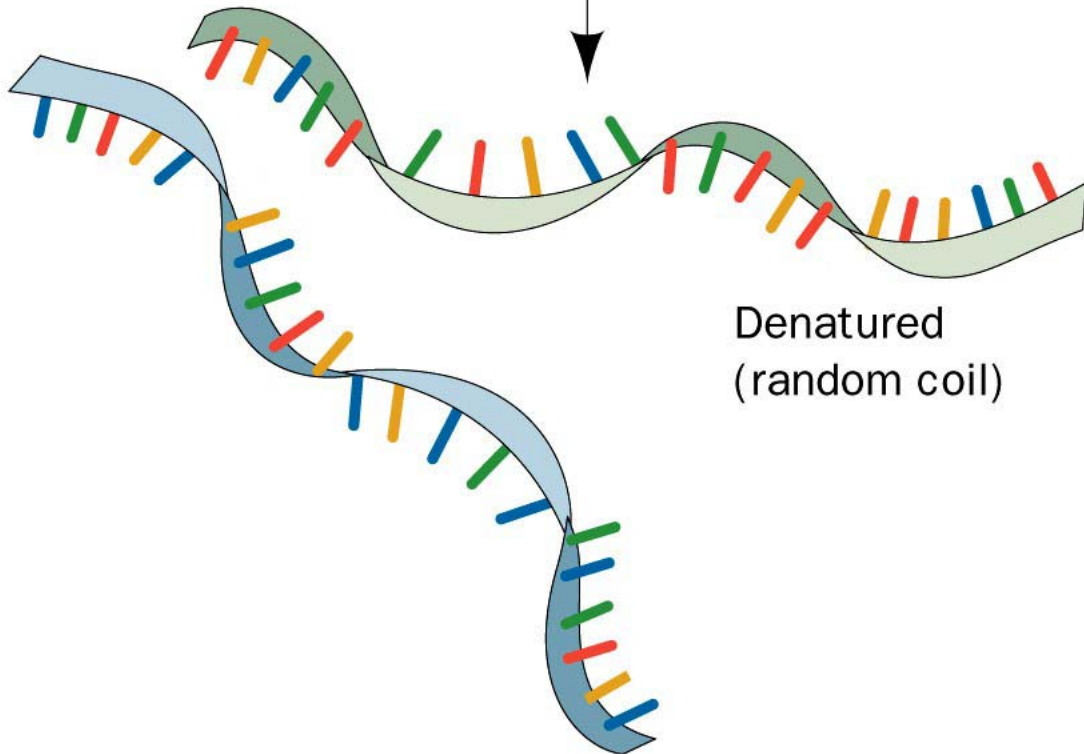


1. ćelije se pomešaju sa LMPA na 37°C
2. imobilizacija ćelija na predmetnom staklu
3. tretman lizirajućim rastvorom (uklanja membrane i histone sa DNK)
4. tretman ćelija alkalijama (denaturacija DNK)
5. nakon elektroforeze ćelije se boje interkalirajućom fluoresecntom bojom

Denaturacija DNK (DNA unwinding)



Native (double helix)



Denatured
(random coil)

Kakvu vrstu oštećenja DNK može da detektuje komet test?

- dvolančane prekide (neutralna, originalna verzija, Ostling i Johanson 1984)
- jednolančane prekide (SSB) (alkalna verzija, Singh i sar., 1988):
 - usled nekompletne ekscizije na mestima popravke DNK
 - mesta osetljiva na alkalije (ALS - alkali labile sites)

Ogromna većina mutagenih agenasa znatno više dovodi do jednolančanih, nego do dvolančanih prekida DNK! ZATO SE UGLAVNOM KORISTI ALKALNA VERZIJA KOJA OTKRIVA KAKO JEDNOLANČANE TAKO I DVOLANČANE PREKIDE DNK.

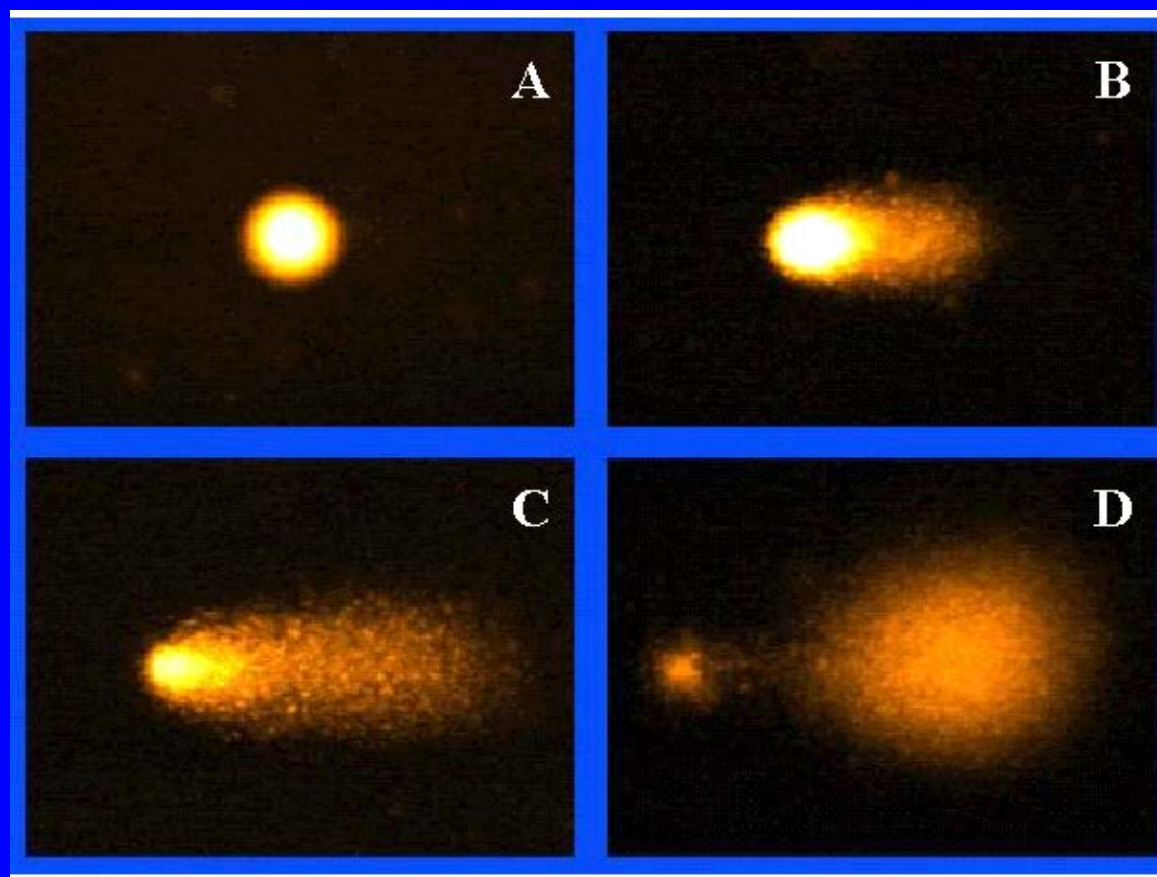
Stepen oštećenja jedarne DNK:

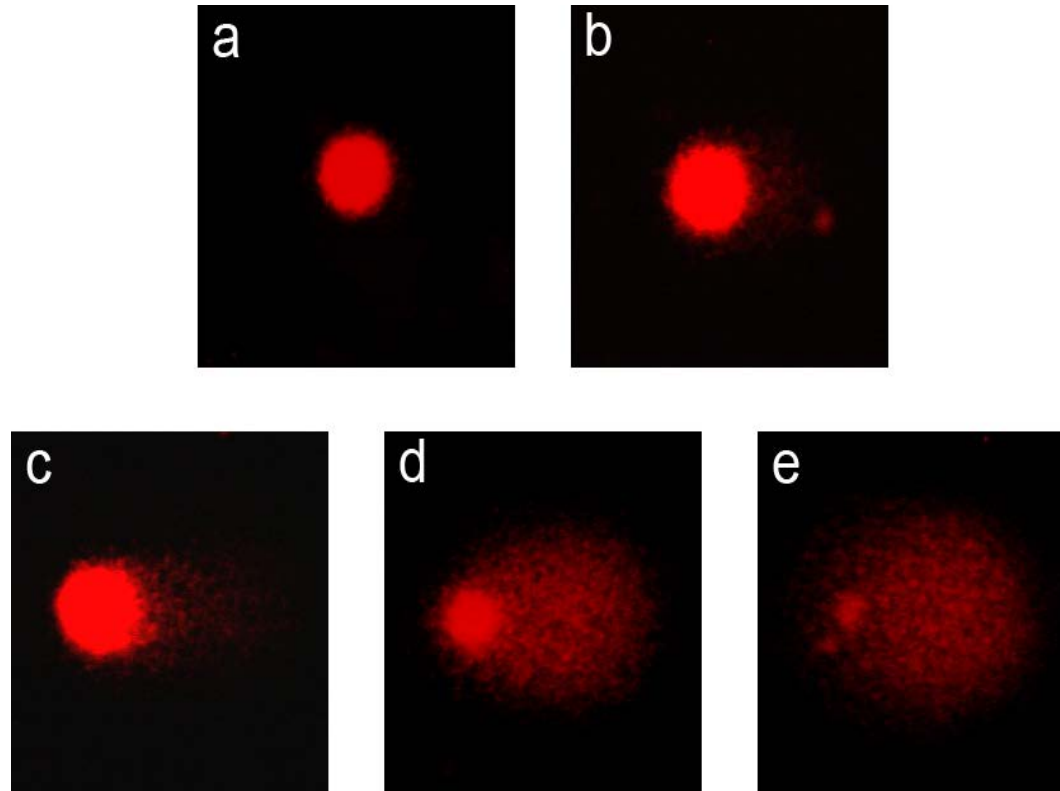
A) bez oštećenja

B) umereno oštećenje

C) veliko oštećenje

D) totalno oštećenje



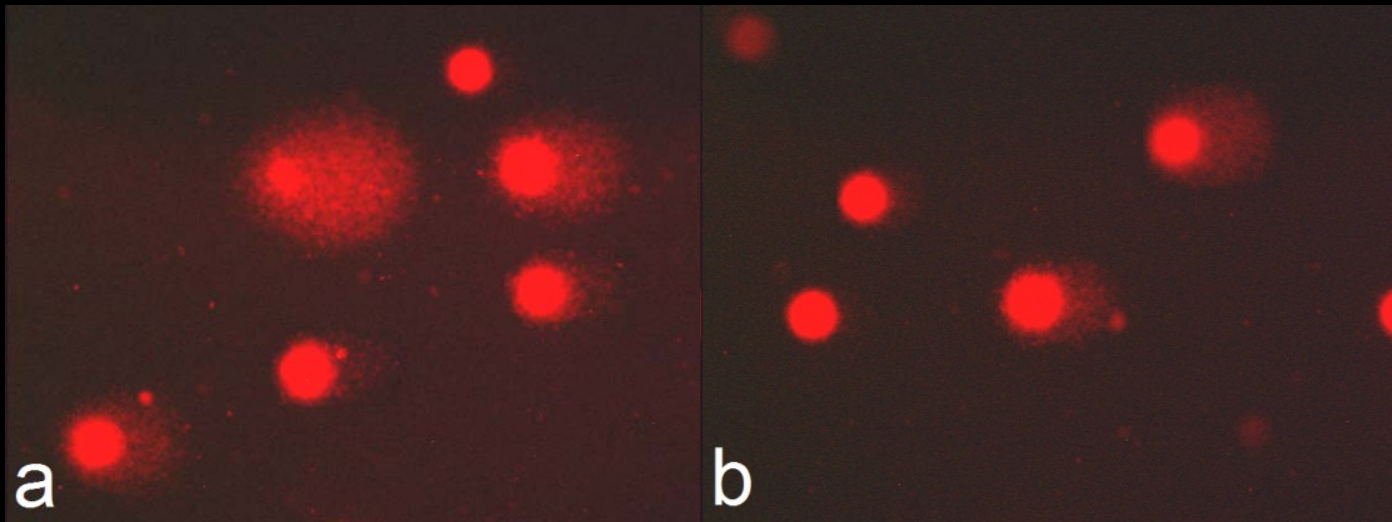


Različiti nivoi oštećenja DNK u limfocitima čoveka (original):

a) bez oštećenja, b) nisko, c) srednje, d) visoko i e) totalno oštećenje

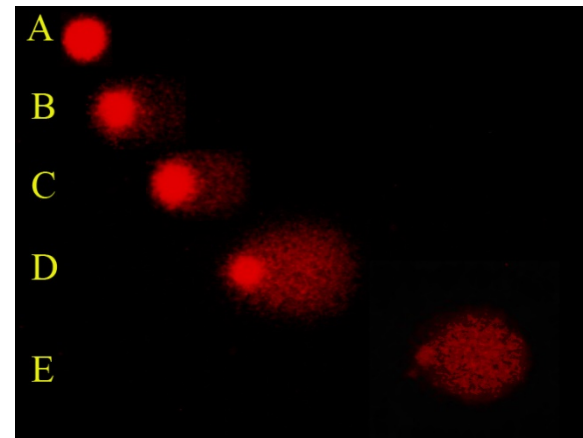
a) komete nakon tretmana amitrazom 3,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$

b) reduced DNA damage in cells treated with 3,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of amitraz and 500 IU/mL of catalase



VIZUELNA KVANTIFIKACIJA OŠTEĆENJA DNK

- A - bez oštećenja, <5%
- B - nizak nivo oštećenja, 5-20%
- C - srednji nivo oštećenja, 20-40%
- D - visok nivo oštećenja, 40-95%
- E - totalno oštećenje, >95%



$$\text{TCS} = 1 \times B + 2 \times C + 3 \times D + 4 \times E$$

Total comet score

gde su B -E procenti ćelija u okviru
gore navedenih kategorija

$$0 < \text{TCS} < 400$$

Primer izračunavanja TCS:

Kategorija oštećenja	procenat ćelija
A	76
B	17
C	3
D	2
E	2

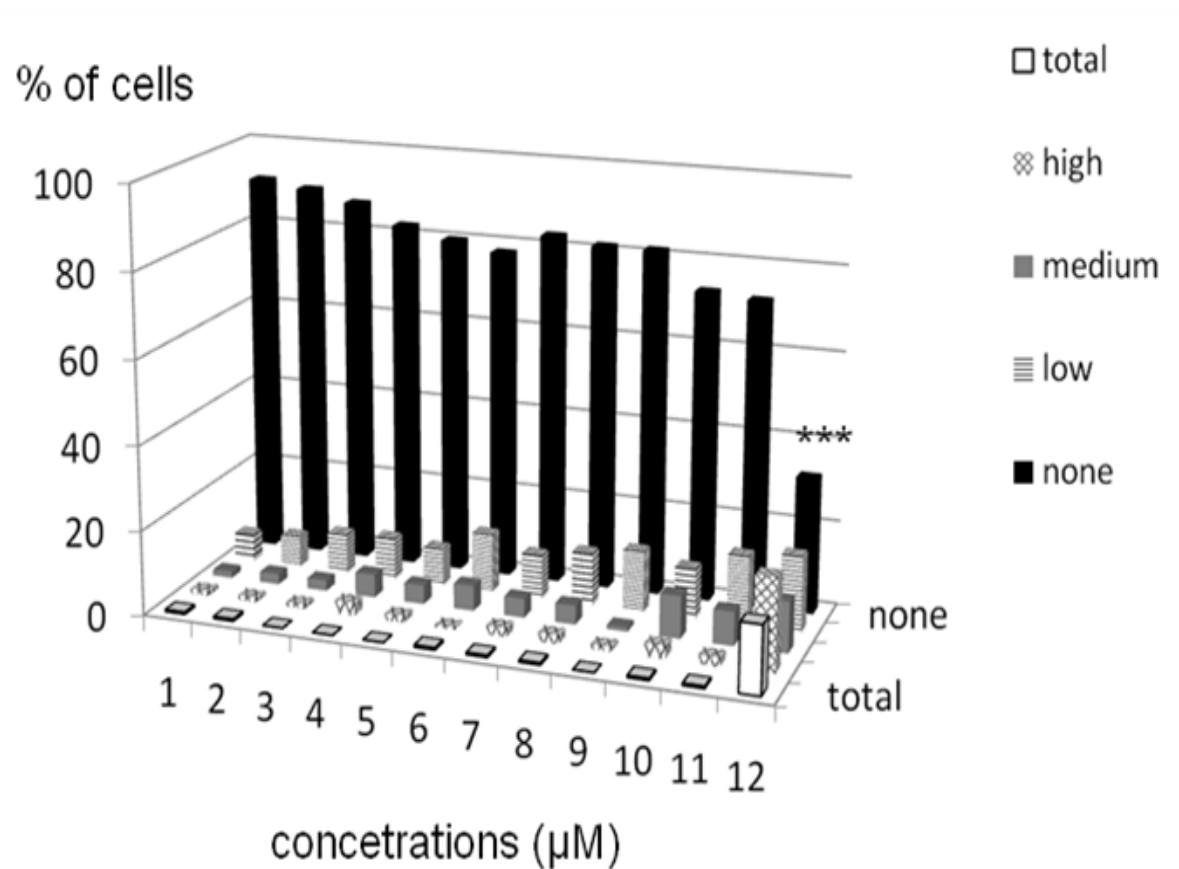
$$\text{TCS} = 17 + 2 \times 3 + 3 \times 2 + 4 \times 2 = 37 \text{ (nizak nivo oštećenja DNK)}$$

Primer izračunavanja TCS:

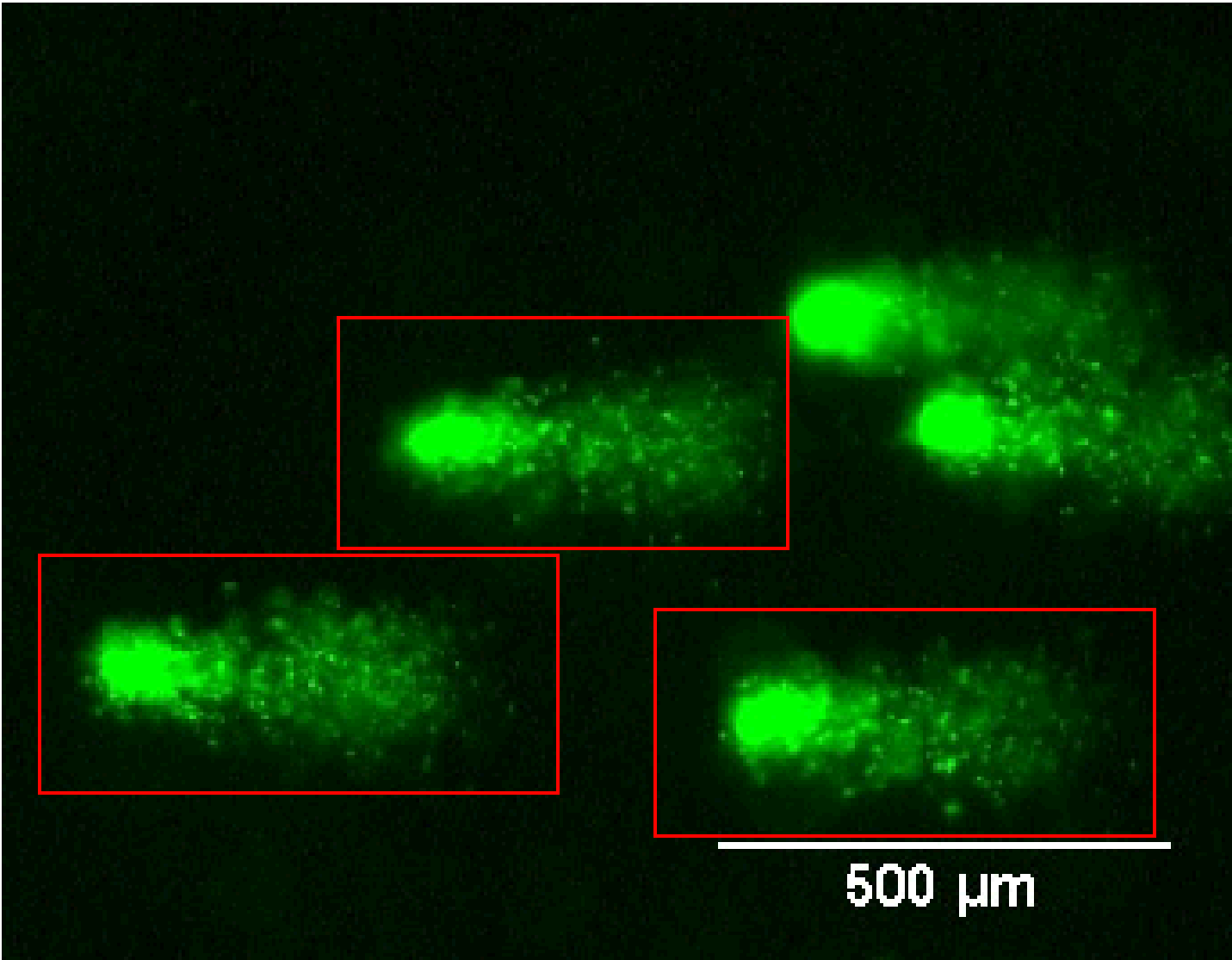
Kategorija oštećenja	procenat ćelija
A	15
B	19
C	28
D	27
E	11

$$\text{TCS} = 19 + 2 \times 28 + 3 \times 27 + 4 \times 11 = 228 \text{ (visok nivo oštećenja DNK)}$$

Grafički prikaz stepena oštećenja DNK pri različitim koncentracijama efedrina



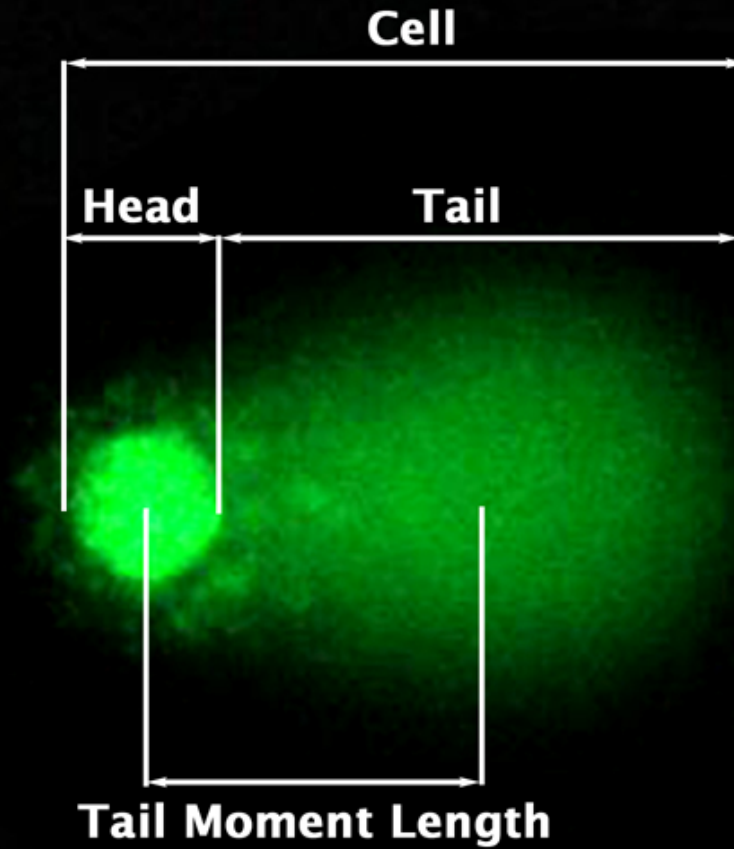

- 1 – negative control
- 2 – Ephedrine 0.0005 μM
- 3 – Ephedrine 0.001 μM
- 4 – Ephedrine 0.01 μM
- 5 – Ephedrine 0.2 μM
- 6 – Ephedrine 1 μM
- 7 – Ephedrine 5 μM
- 8 – Ephedrine 50 μM
- 9 – Ephedrine 150 μM
- 10 – Ephedrine 300 μM
- 11 – Ephedrine 500 μM
- 12 – 100 μM H_2O_2



500 μm

$$\text{OTM} = (\text{količina DNK u repu}) \times (\text{rastojanje između regiona glave i repa})$$

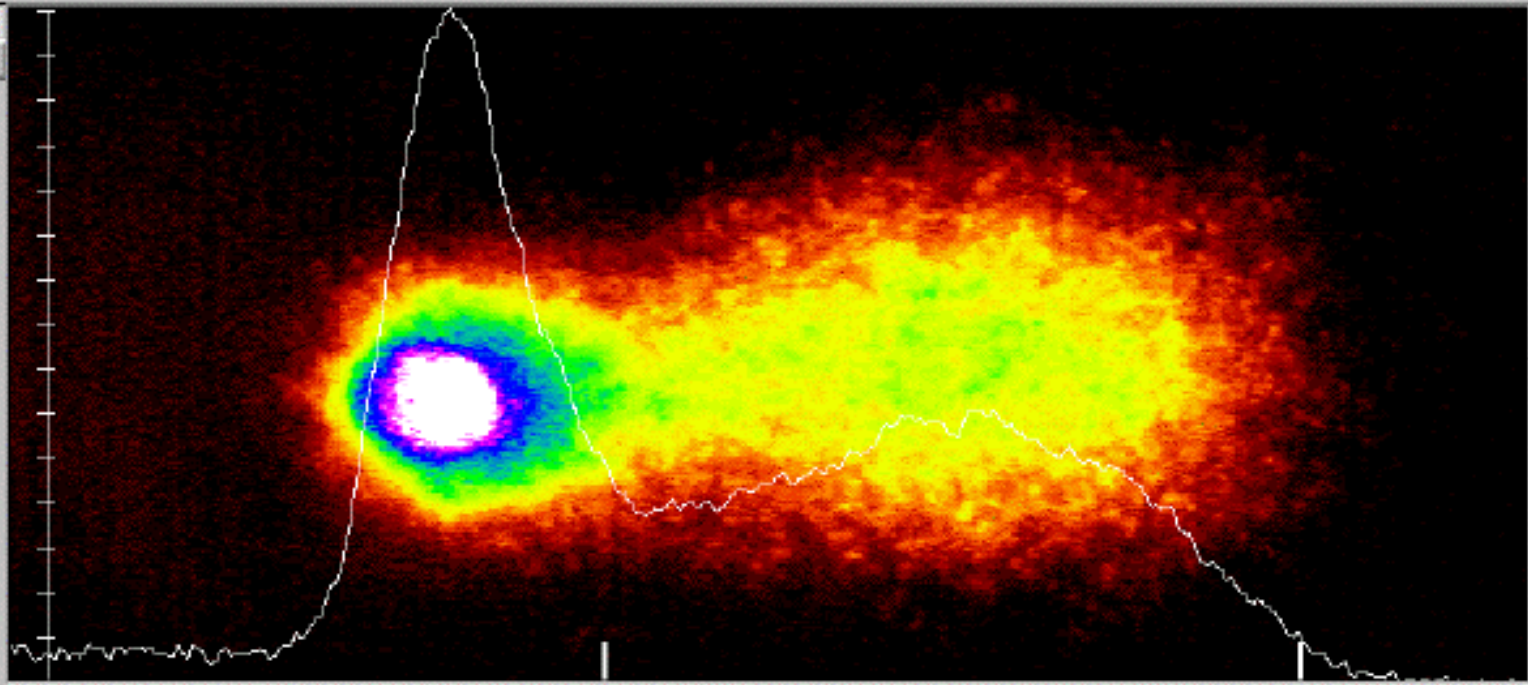
Moment repa



Comet Assay - Study: TestComets

View
Capture

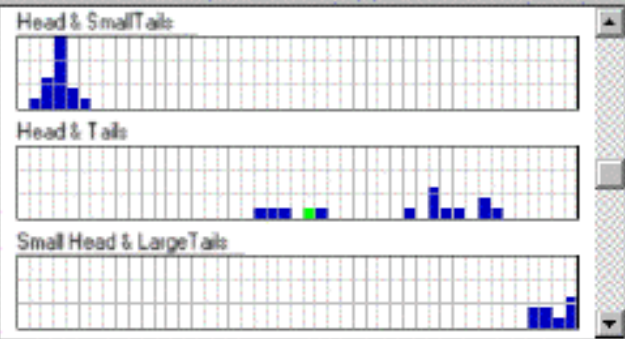
Display Range



All Head | Head_SmallTails | Head_Tails | SmallHead_LargeTails | All Tail

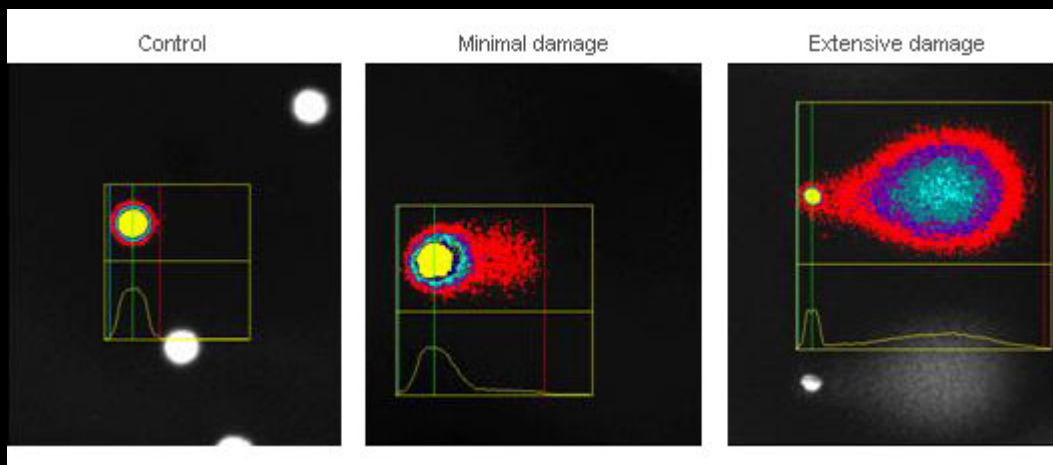
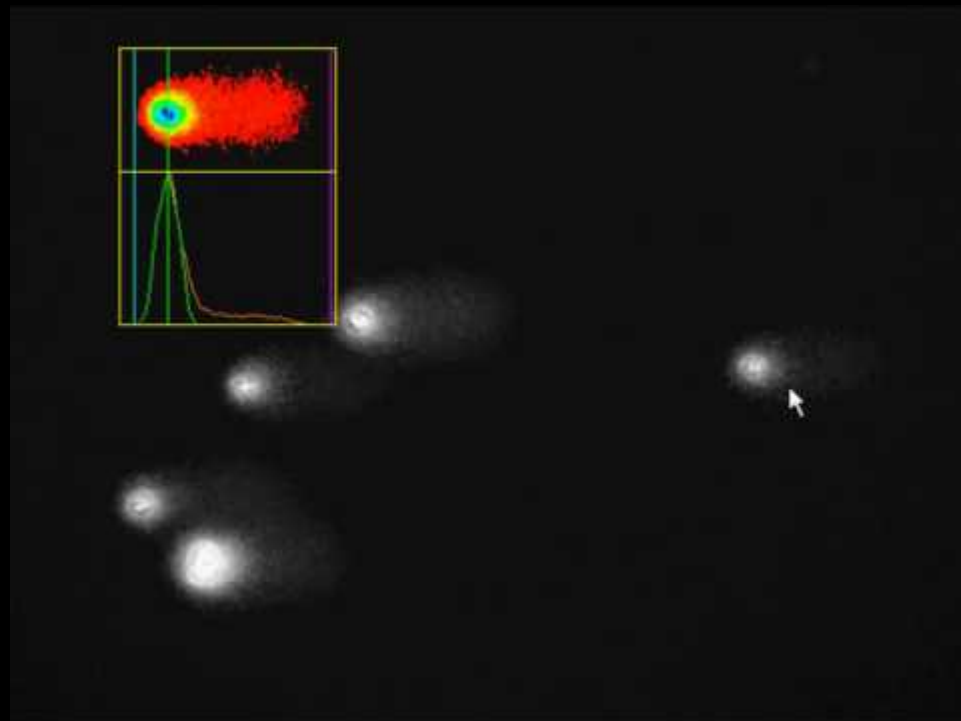
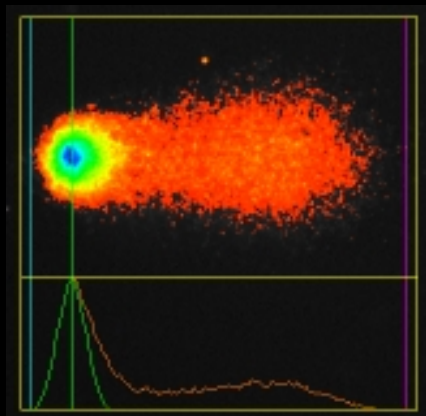
Index	Moment	M. Arm	M. Inertia	Fragment	% DNA	Length	Area	Intensity
1	127.64	156	2.28 e4	14.14	81.64	278	4.00 e4	3.45 e6
2	39.15	86	4.60 e3	11.39	45.42	213	3.92 e4	8.26 e6
3	56.57	109	8.01 e3	9.36	51.84	235	3.53 e4	4.37 e6
4	46.31	98	6.45 e3	8.17	47.28	246	5.04 e4	1.16 e7
5	127.64	156	2.28 e4	14.14	81.64	278	4.00 e4	3.45 e6
6	104.35	135	1.75 e4	15.09	77.44	279	5.12 e4	6.29 e6
7	142.28	168	2.72 e4	14.81	84.94	293	4.20 e4	3.17 e6
8	117.79	156	2.23 e4	13.75	75.53	312	6.17 e4	1.33 e7
9	113.86	153	2.13 e4	12.73	74.21	305	5.85 e4	8.33 e6
10	113.82	154	2.15 e4	15.10	73.84	318	5.94 e4	1.45 e7
11	107.03	199	2.62 e4	8.69	53.75	368	5.60 e4	9.27 e6

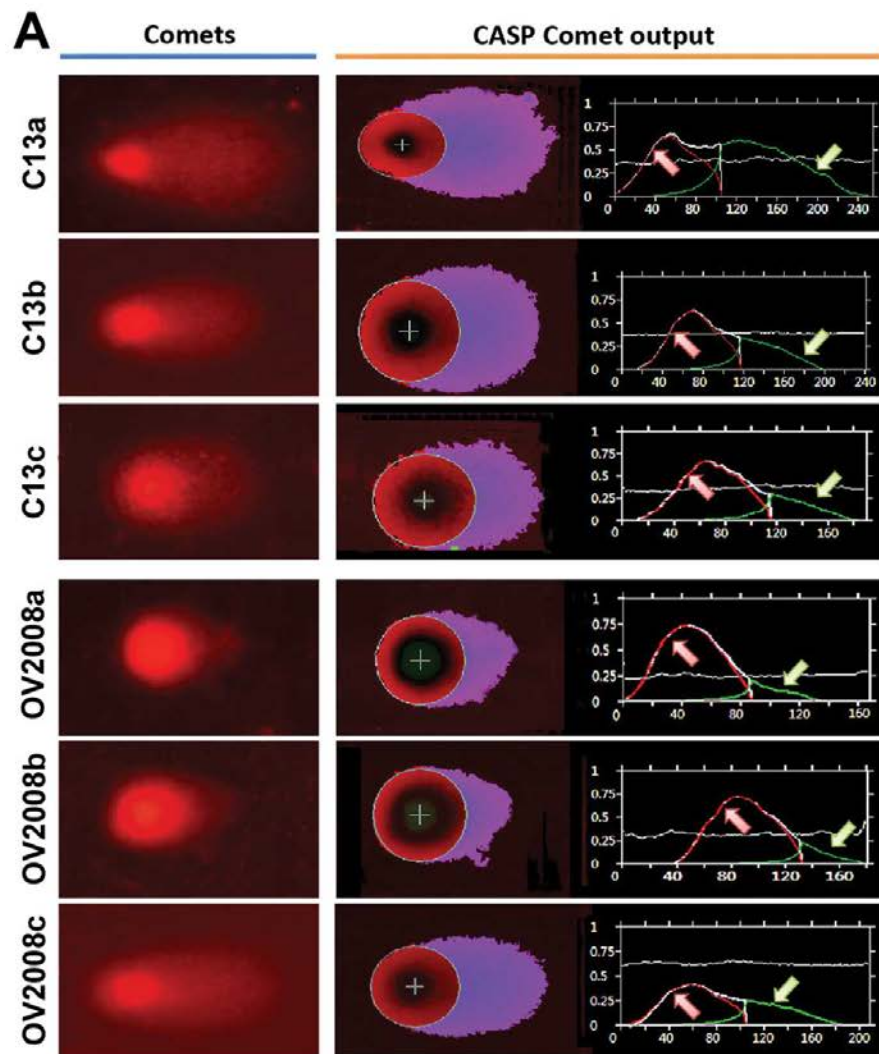
Comments:



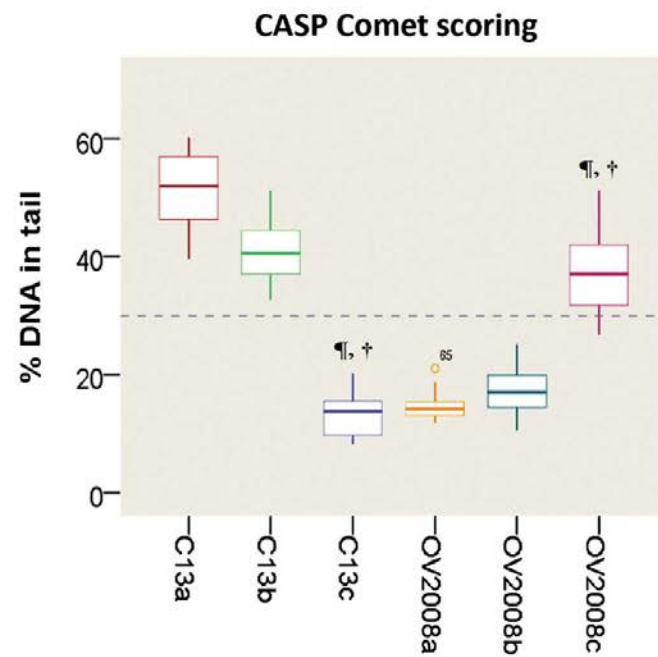
Select Measure to be Graphed: % DNA

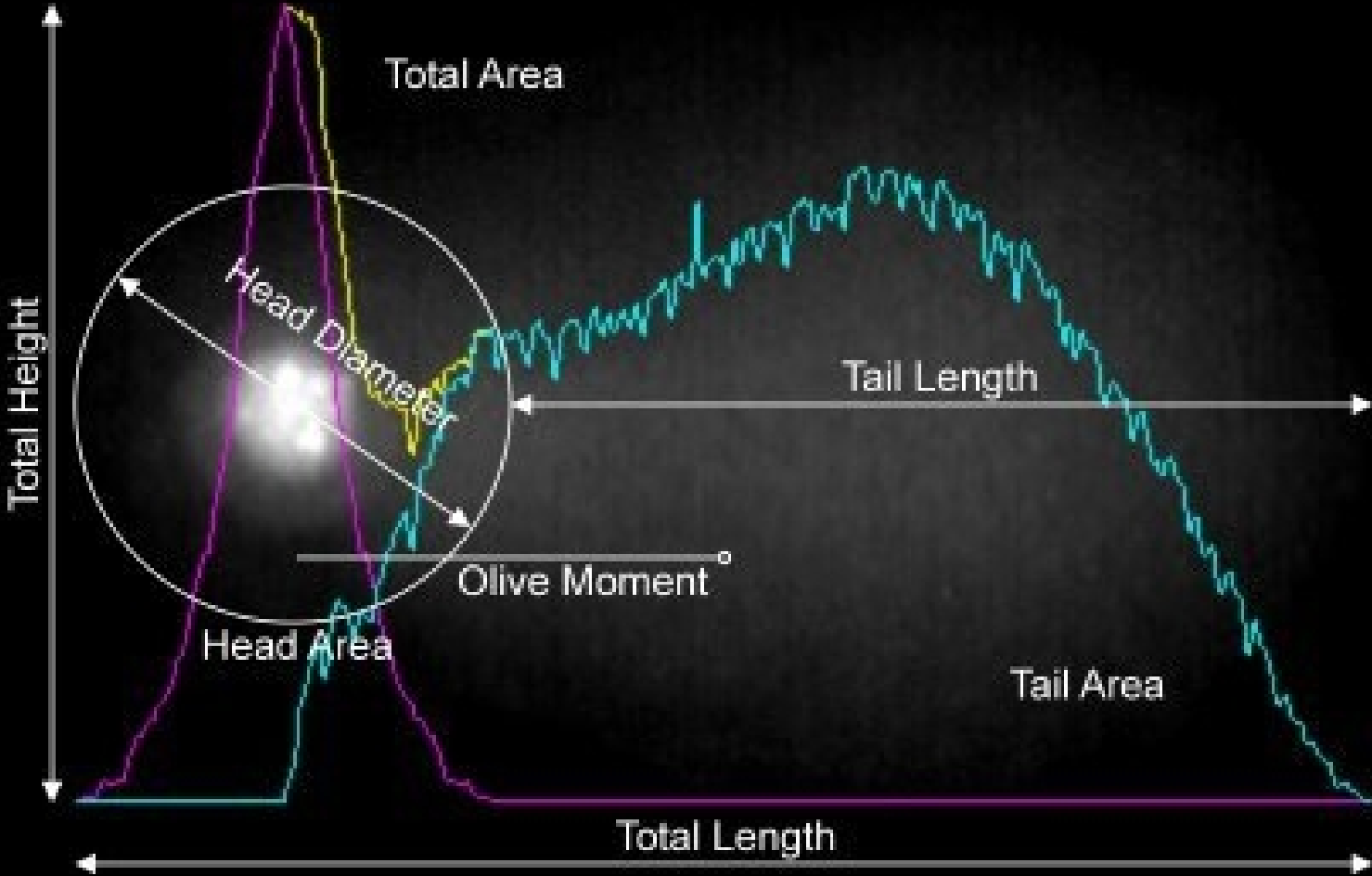
Softverska analiza kometa





B

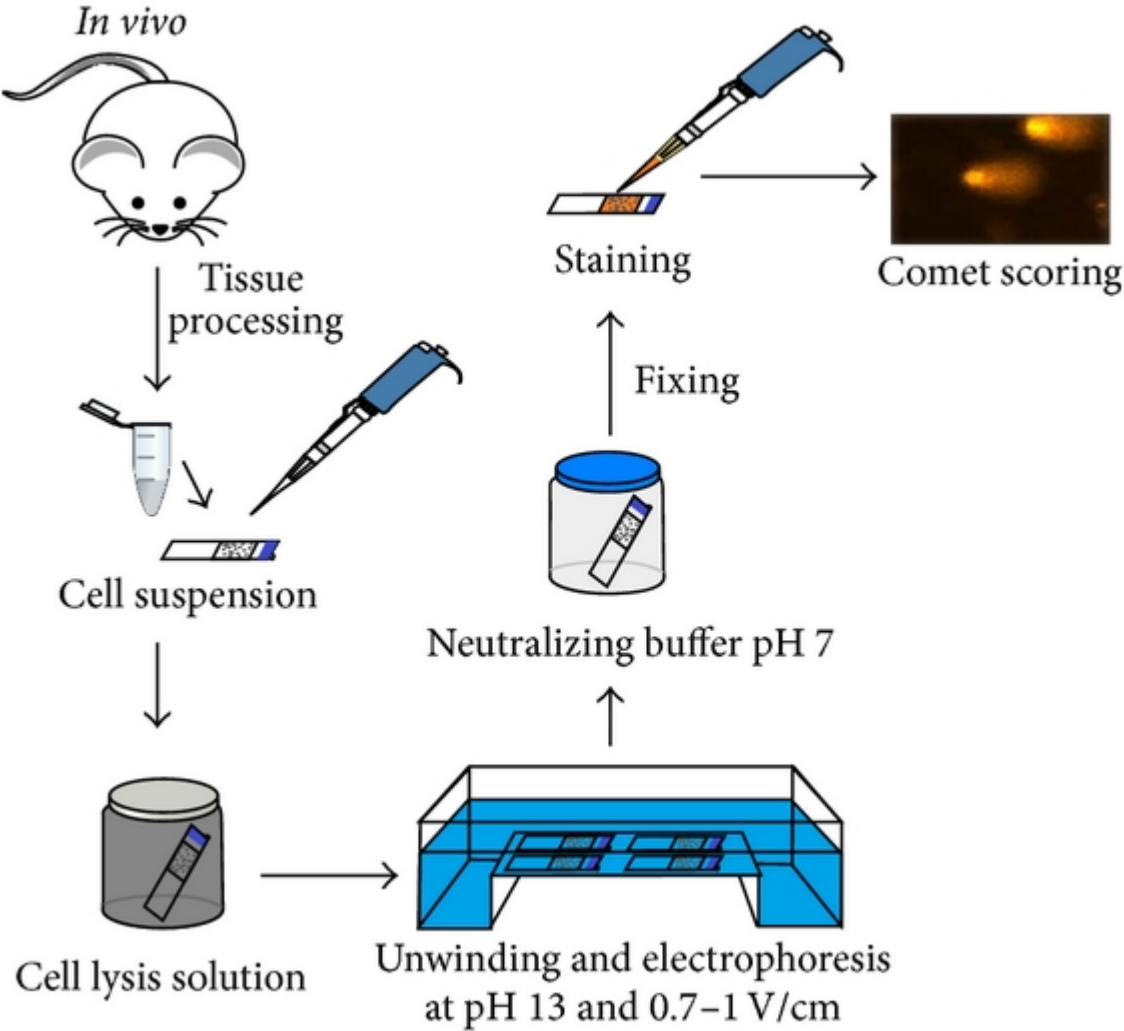




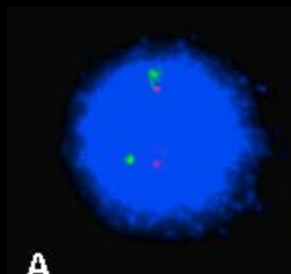
Primene Komet testa:

- **Genetička toksikologija** (*in vitro, in vivo*)
- **Kinetika reparacije DNK**
- **Apoptoza**
- Vizuelna kvantifikacija dvolanačanih DNK prekida **kod bakterija**
- **Kliničke primene** (prenatalna dijagnostika, sindromi sa deficijentnom reparacijom DNK, podložnost za oboljevanje od raka, terapija kancera, katarakta, Diabetes mellitus, reumatoidni artritis, sistemski lupus eritematozus, Alzheimerova bolest itd.)
- **Biomonitoring** (starenje, fizičke vežbe, pothranjenost, ishrana, uticaj ozona, populacione studije, biomonitoring u ekosistemima)
- **Analize ćelijskog ciklusa**
- **Biologija slobodnih radikala**
- **Toksikologija ishrane** (fitoprotektanti, produkti fermentacije u crevu kao antioksidansi).

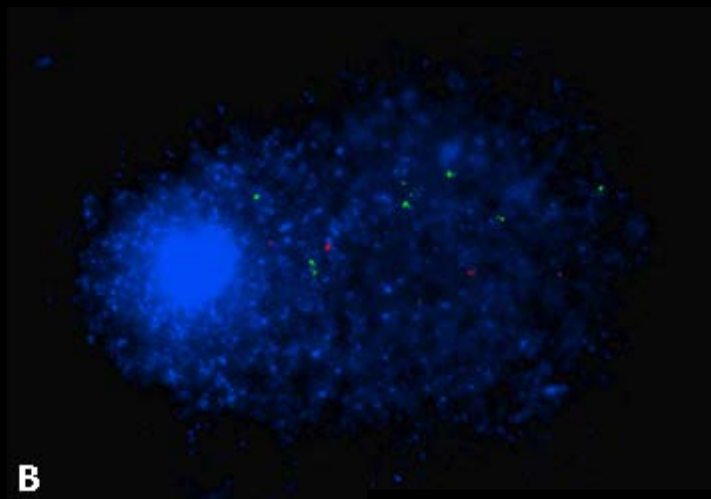
IN VIVO KOMET TEST



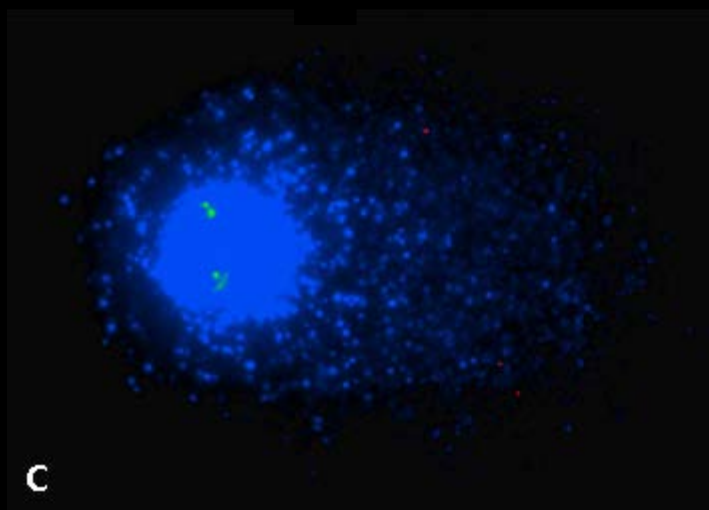
Komet FISH (fluorescentna *in situ* hibridizacija)



A



B

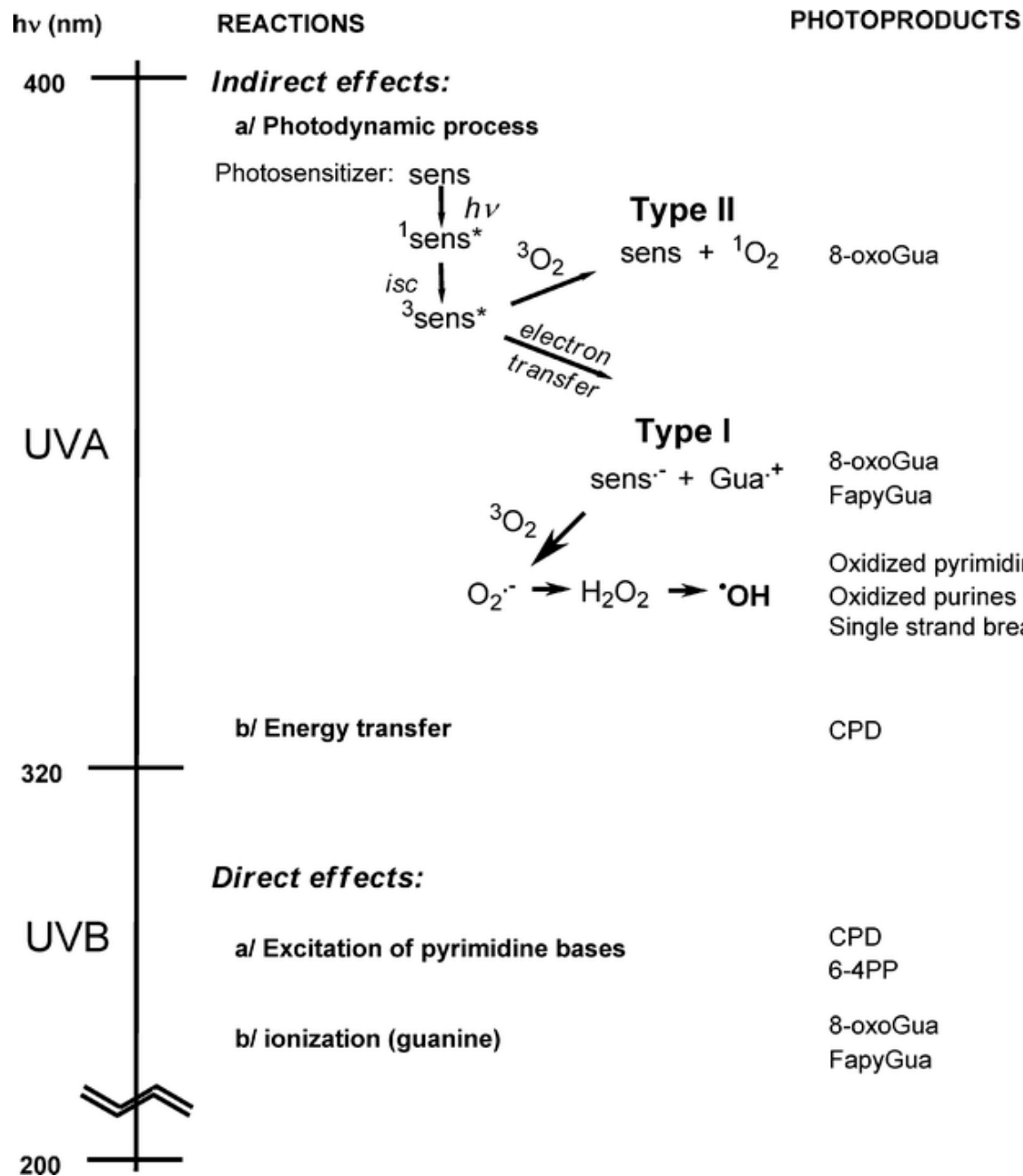


C

TEST OSETLJIVOSTI GENOMA LIMFOCITA

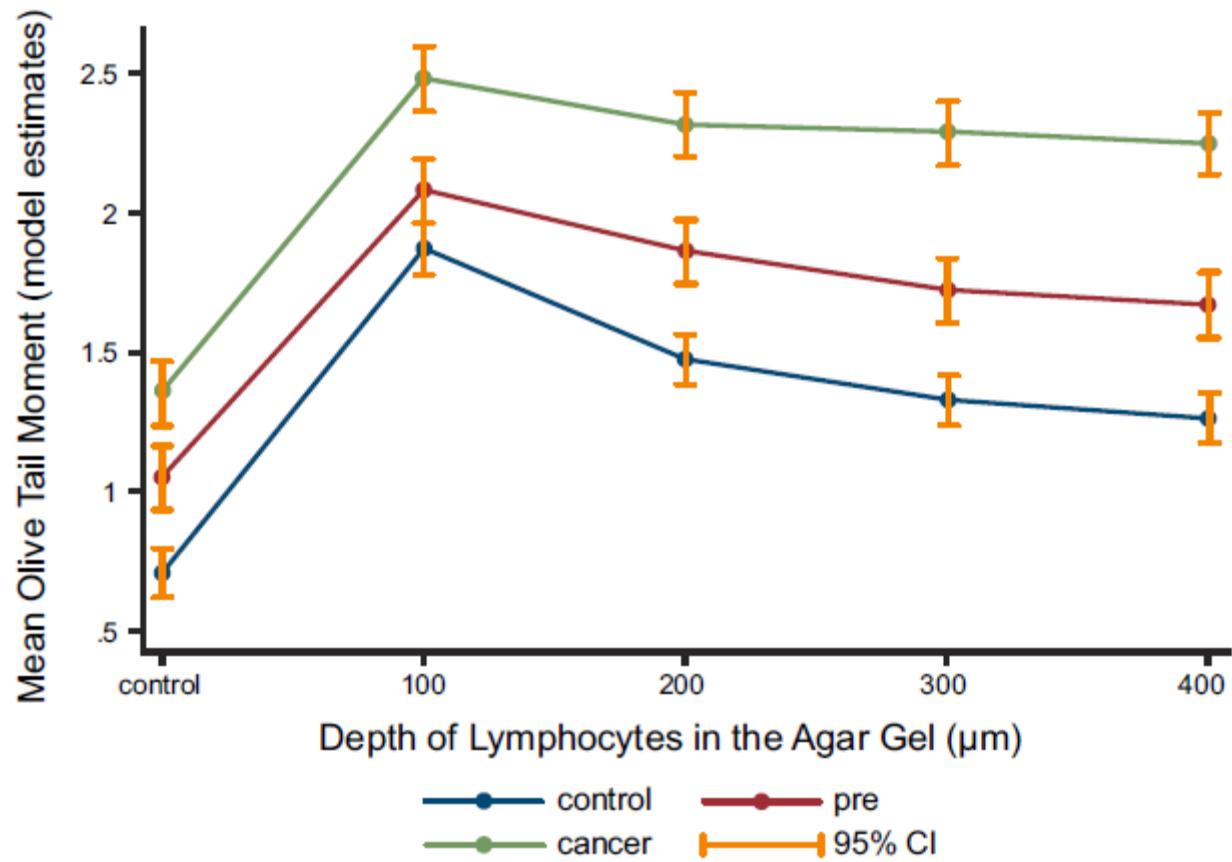
LYMPHOCYTE GENOME SENSITIVITY (LGS) TEST

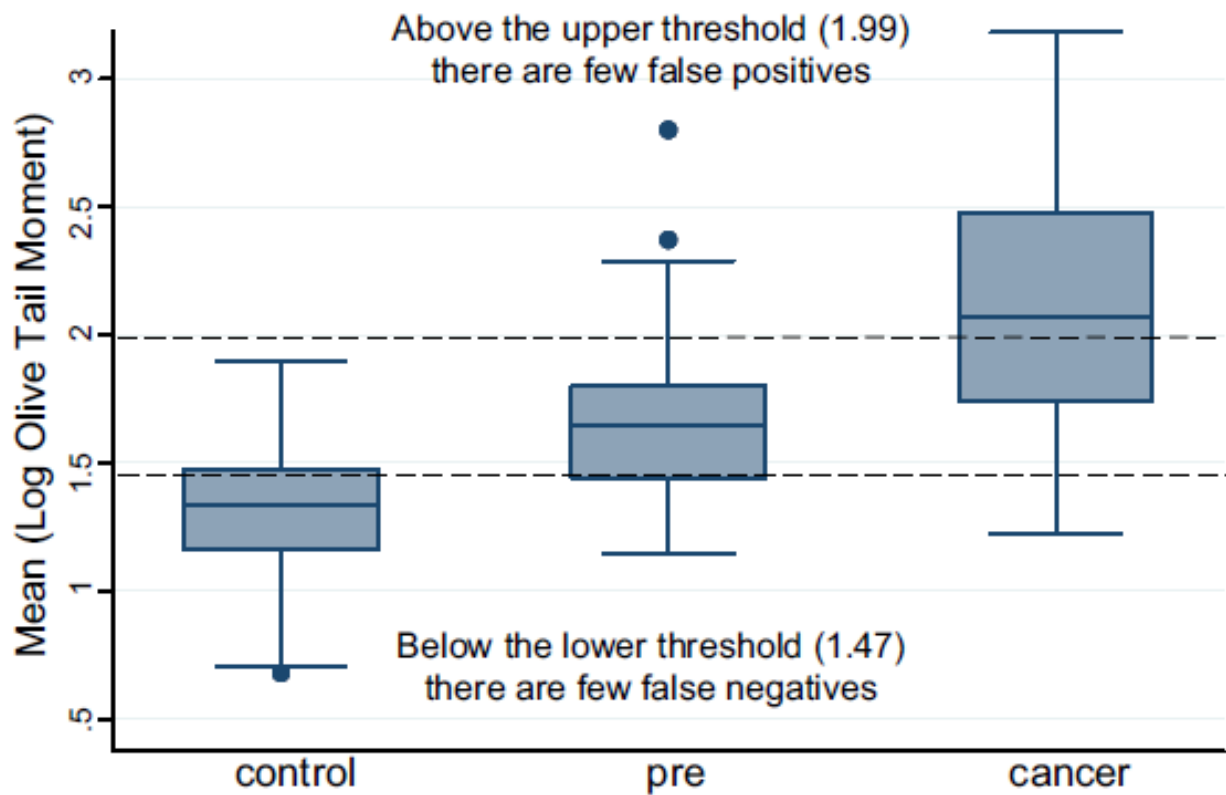
- modifikacija komet testa
- zasniva se na razlikama u osetljivosti limfocita prema UVA zračenju
- limfociti obolelih od raka su osetljiviji na dejstvo UVA zračenja
- kod osoba sa premalignitetima javlja se intermedijarna osetljivost
- ispituje se osetljivost genoma limfocita na različitim dubinama u agarozu, samim tim intenzitet UV zračenja je različit



UV zračenje izaziva:

- oksidativni stres
- ALS
- jedno- i dvolančane prekide DNK
- dimere pirimidina





УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ФАКУЛТЕТ ВЕТЕРИНАРСКЕ МЕДИЦИНЕ
Катедра за **БИОЛОГИЈУ**
11000 Београд, Бул. ослобођења 18.
Tel: +381(11) 265 88 94



UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE
Department of **BIOLOGY** 11000 Belgrade, Bul.
oslobodjenja 108
Tel: +381(11) 265 88 94

Laboratorija za genetiku životinja

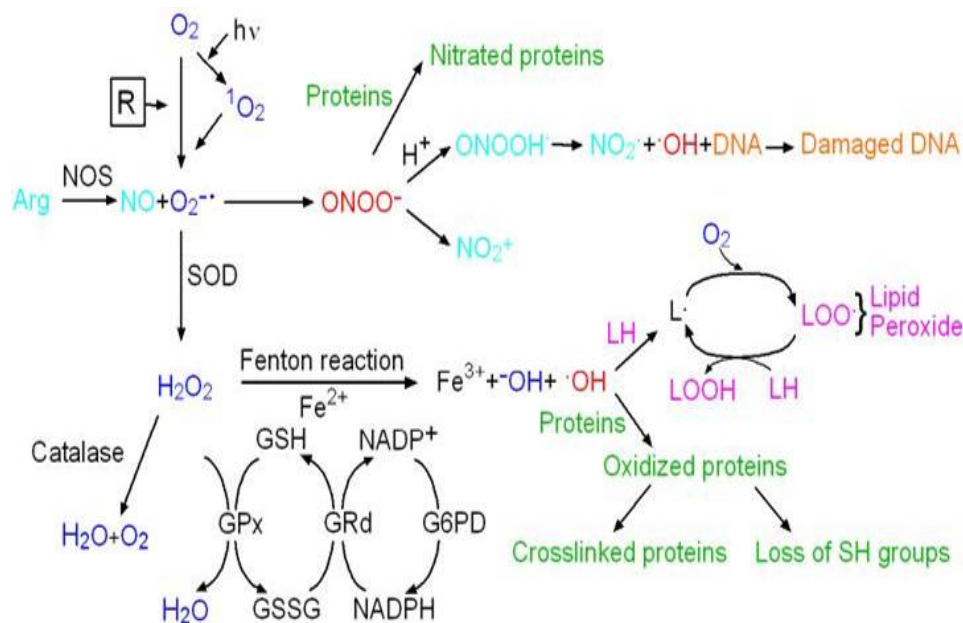
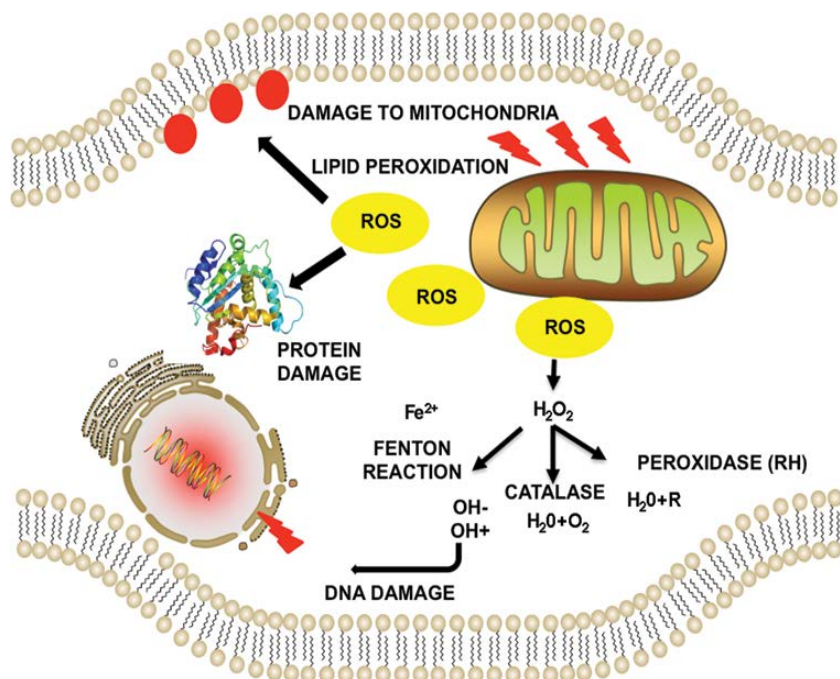
**Analiza parametara oksidativnog stresa
u funkciji procene oštećenja biomolekula**

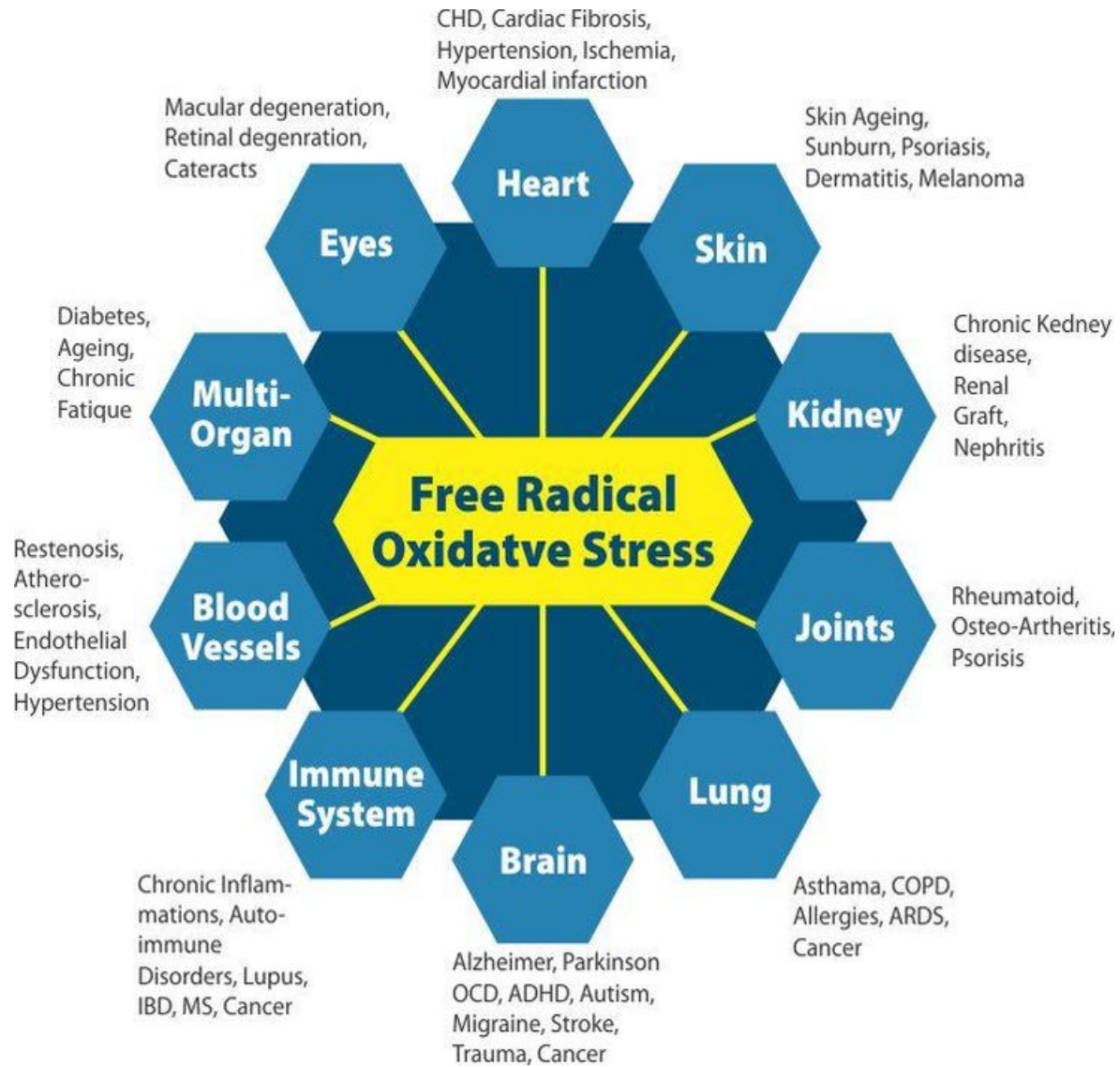
OKSIDATIVNI STRES

Oksidativni stres nastaje kao posledica povećane produkcije slobodnih radikala ili redukovane antioksidativne odbrane

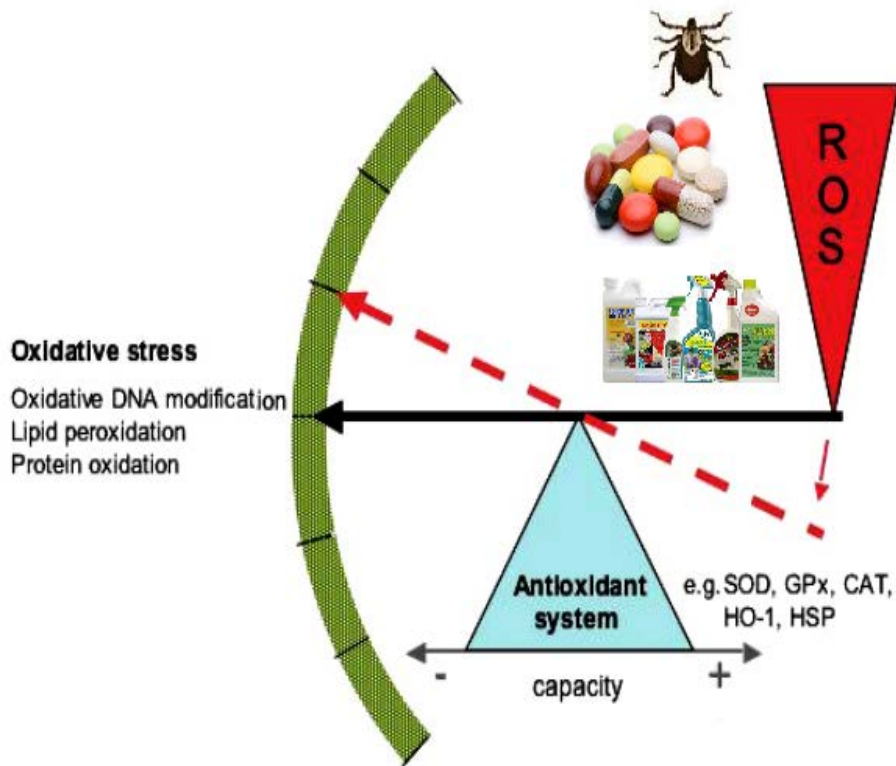


Nivo ROS se može povećati toliko da ćelija više nije sposobna da se zaštiti i tada ove kiseonične vrste prouzrokuju oštećenja ćelijskih komponenti uključujući **lipide, proteine i DNK**





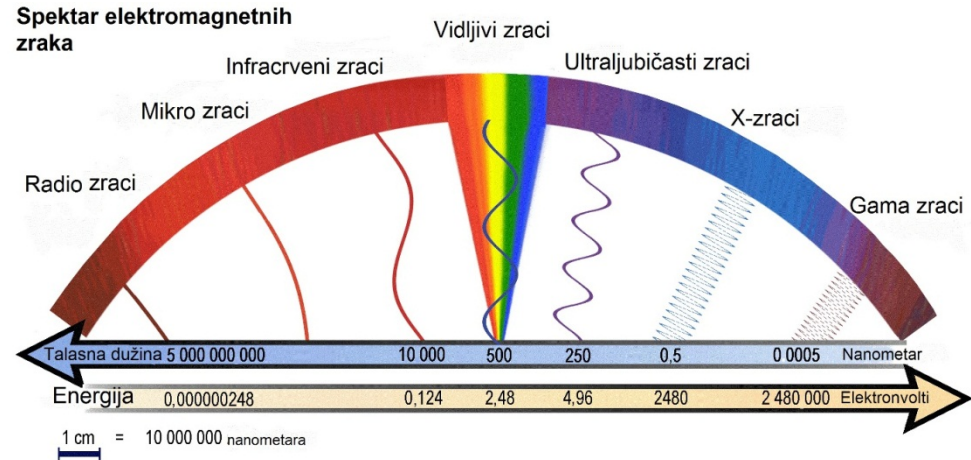
OKSIDATIVNI STRES



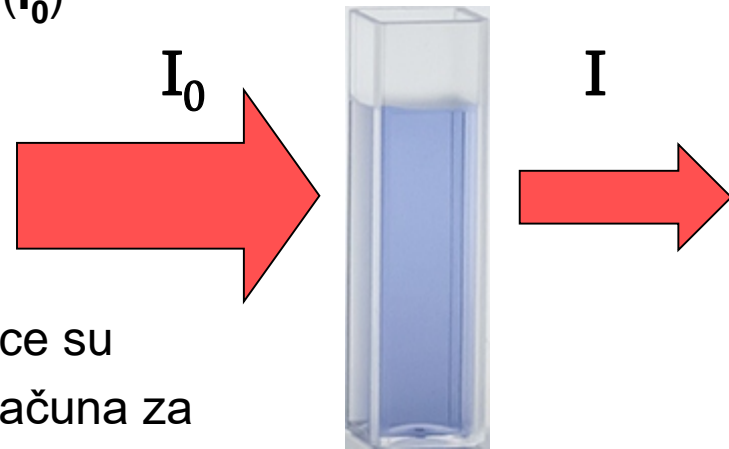
Određivanje parametara oksidativnog stresa

- ✓ Aktivnost antioksidativnih enzima (SOD, CAT, GST)
- ✓ Koncentracija produkta oksidativnog oštećenja (MDA)

UV/VIS spektrofotometrija



- Spektrofotometar meri intenzitet svetla koje je prošlo kroz analizirani uzorak (I) i upoređuje ga sa intenzitetom upadnog svetla (I_0)



- Spektrofotometrom se mogu odrediti koje supstance su prisutne u uzorku, kao i u kojoj količini putem proračuna za posmatrane talasne dužine.