

Měření antioxidační aktivity metodou oxidativního štěpení + plasmidové DNA

Jakub Tremel

Ústav přírodních léčiv, FaF VFU Brno

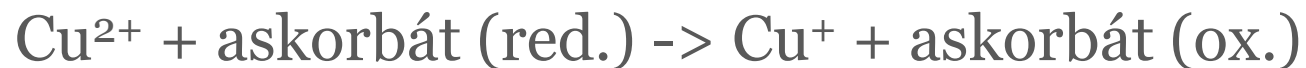
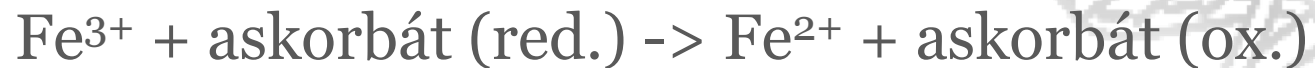
2010

+ Proč hledat antioxidanty?

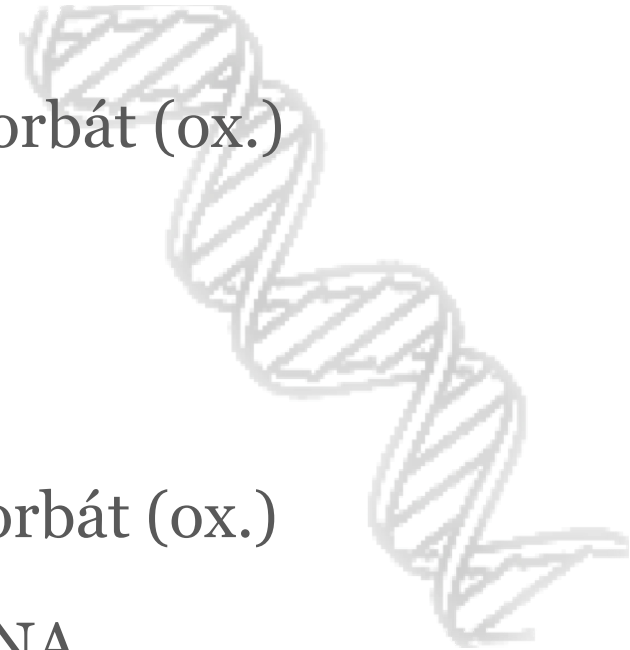
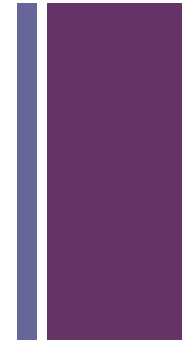
- oxidační stres = nerovnováha tvorby × likvidace ROS
- oxidační stres -> neurodegenerativní nemoci (AD, PD), zánět, nádorová onemocnění, stárnutí obecně..
- JAK hledat antioxidanty?
 - > metody *in-vitro* (+/-), *in-vivo*
 - > látka XY má “antioxidační účinky” × pomůže?

+ Metodika - princip

■ Fentonova reakce:

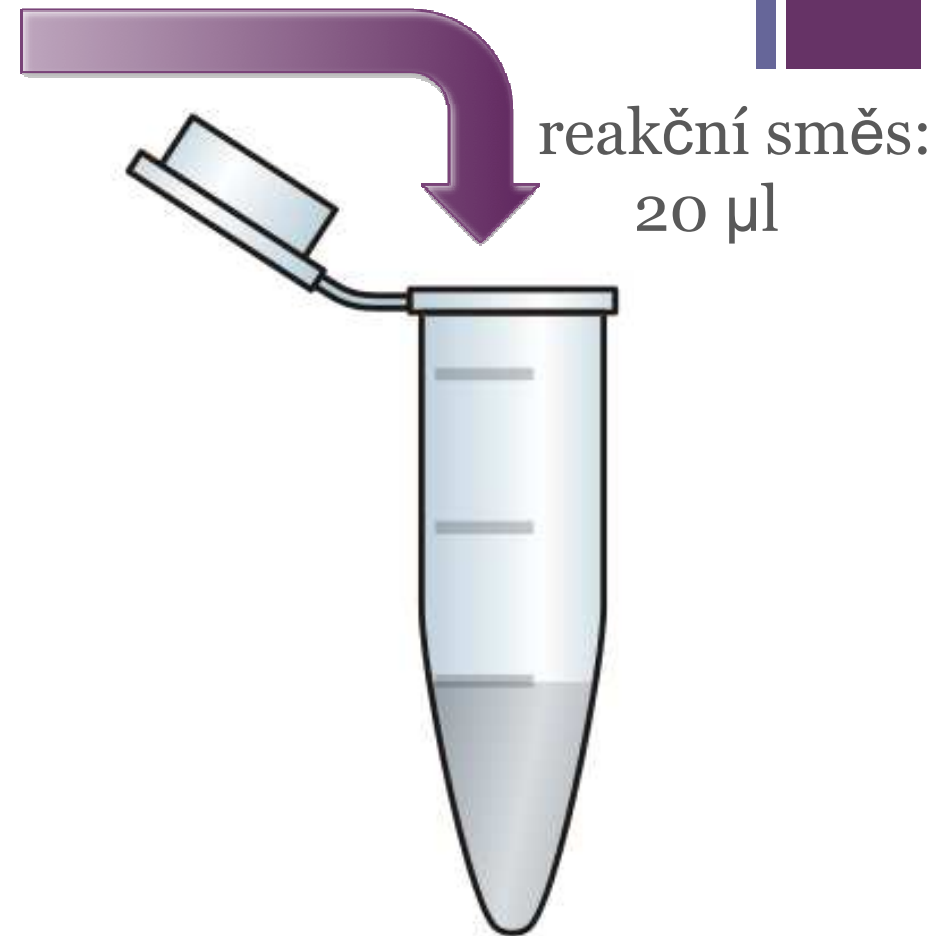


■ hydroxylový radikál $\text{OH}\cdot$ poškodí DNA



+ Metodika – reakční směs

- plasmid – DNA
300 ng/reakce
- TE pufr
- roztok testované látky
(20 – 200 – 200 μM)
- H_2O_2 (1,32 mM)
- askorbát (1,66 mM)
- CuSO_4 (0,33 mM)



+ Metodika - vizualizace

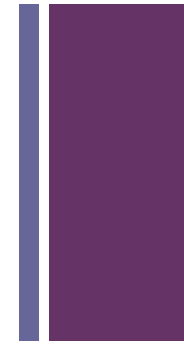
- inkubace 1 hod; 37 °C

- gelová elektroforéza – agarosa 0,8%

- výpočet AUC – AlphaEaseFC:

$$Ratio = \frac{AUC_{OC} + 2 \cdot AUC_L}{AUC_{OC} + 2 \cdot AUC_L + AUC_{CCC}}$$

$$Di = \frac{Ratio_{vzorek}}{Ratio_{poz.kontrola}}$$



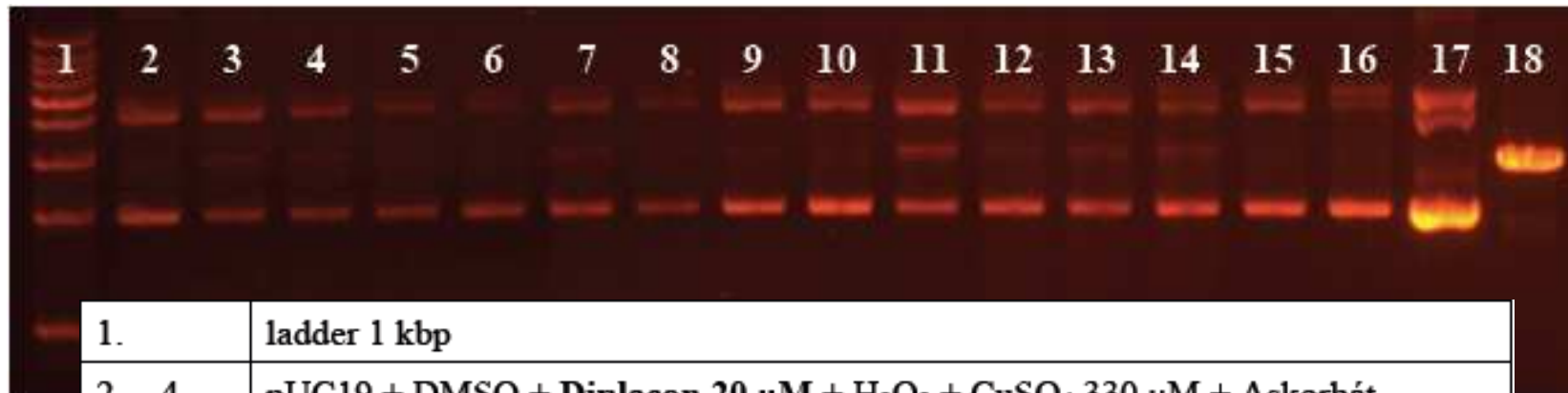
OC

L

CCC

+ Výsledky

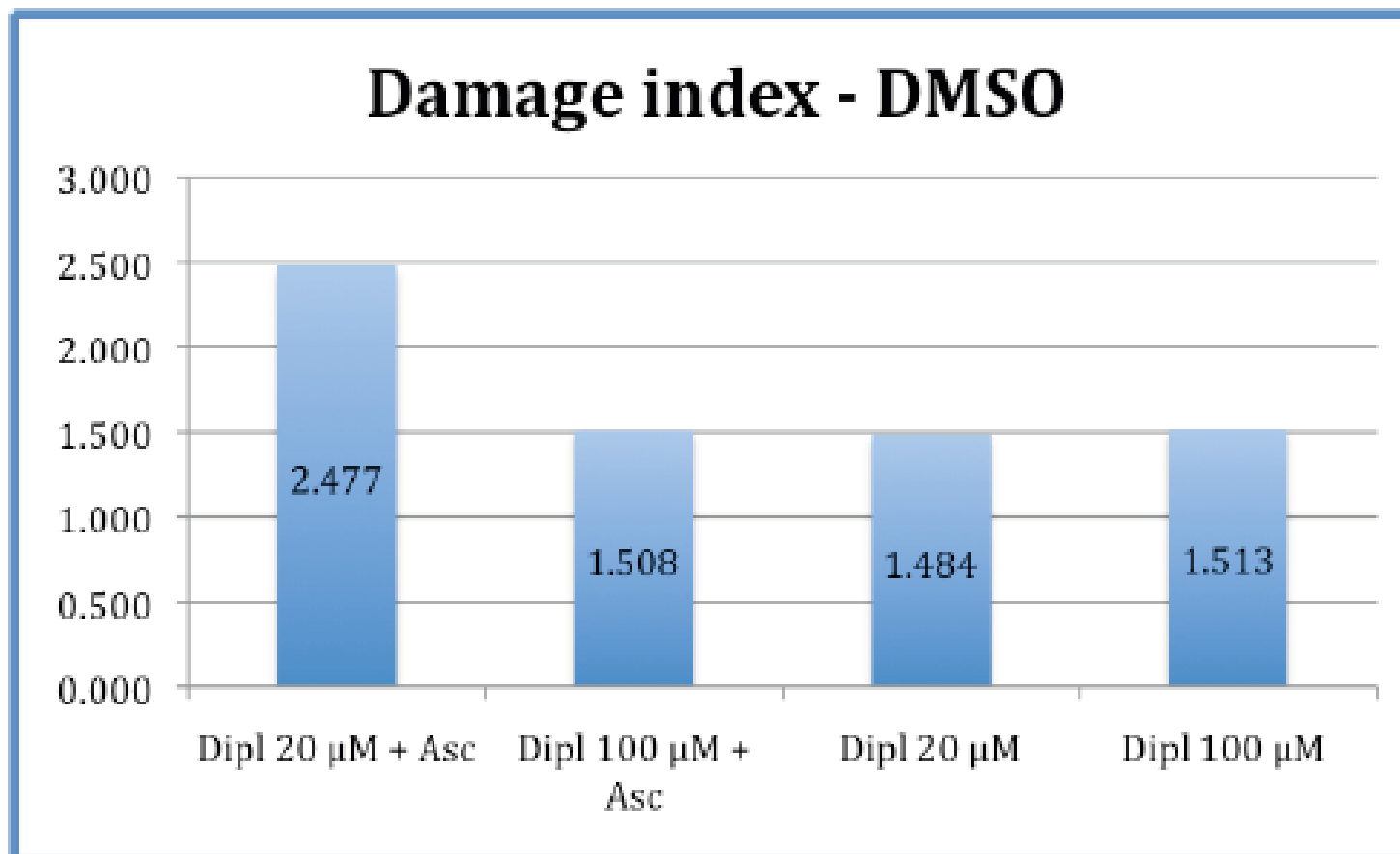
Diplacon 20 a 100 μM - DMSO



1.	ladder 1 kbp
2. - 4.	pUC19 + DMSO + Diplacon 20 μM + H ₂ O ₂ + CuSO ₄ 330 μM + Askorbát
5. - 7.	pUC19 + DMSO + Diplacon 100 μM + H ₂ O ₂ + CuSO ₄ 330 μM + Askorbát
8.	pUC19 + DMSO + H ₂ O ₂ + CuSO ₄ 330 μM + Askorbát
9. - 11.	pUC19 + DMSO + Diplacon 20 μM + H ₂ O ₂ + CuSO ₄ 330 μM
12. - 14.	pUC19 + DMSO + Diplacon 100 μM + H ₂ O ₂ + CuSO ₄ 330 μM
15.	pUC19 + DMSO + H ₂ O ₂ + CuSO ₄ 330 μM
16.	pUC19 + DMSO + H ₂ O
17.	pUC19
18.	pUC19 lin.

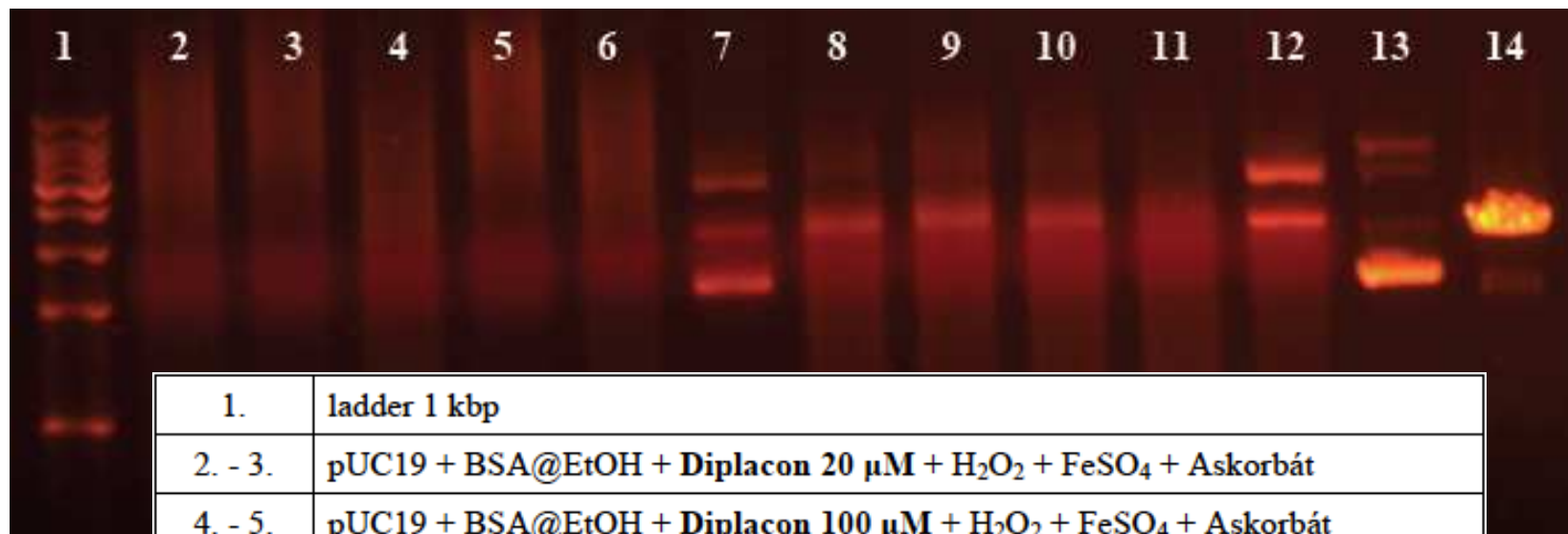
+ Výsledky

Diplacon 20 a 100 μM - DMSO



+ Výsledky

Diplacon 20 a 100 μM – BSA

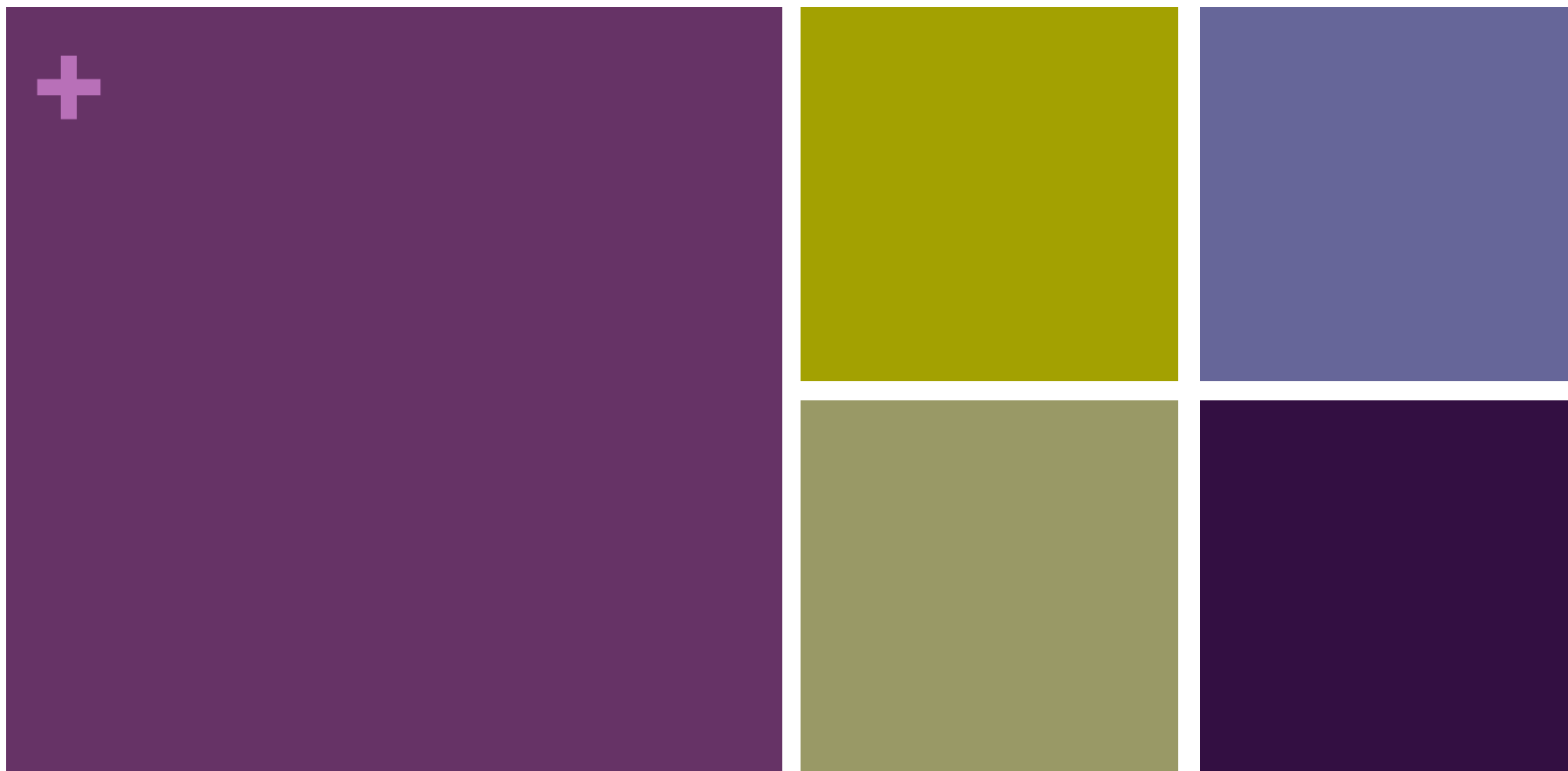


1.	ladder 1 kbp
2. - 3.	pUC19 + BSA@EtOH + Diplacon 20 μM + H_2O_2 + FeSO_4 + Askorbát
4. - 5.	pUC19 + BSA@EtOH + Diplacon 100 μM + H_2O_2 + FeSO_4 + Askorbát
6.	pUC19 + BSA@EtOH + H_2O_2 + FeSO_4 + Askorbát
7. - 8.	pUC19 + BSA@EtOH + Diplacon 20 μM + H_2O_2 + FeSO_4
9. - 10.	pUC19 + BSA@EtOH + Diplacon 100 μM + H_2O_2 + FeSO_4
11.	pUC19 + BSA@EtOH + H_2O_2 + FeSO_4
12.	pUC19 + BSA@EtOH + H_2O
13.	pUC19
14.	pUC19 lin.

+ Výsledky

- pokračování: testování dalších solubilizátorů – Tween, Cremofor
- testování dalších extraktů, optimalizace





Děkuji za
pozornost!