

Laboratorium 7

Testy na genotoksyczność

Test rewersji mutacji – test Ames

Test Ames jest testem bakteryjno-ssaczym. Organizmami testowymi są tutaj bakterie *Salmonella typhimurium*. W wyniku mutacji, celowo wprowadzonej do ich genomu, zostały one pozbawione zdolności wytwarzania jednego z aminokwasów – histydyny. W konsekwencji nie mogą one rozwijać się na podłożu mikrobiologicznym, które nie zawiera histydyny. Test Ames polega na inkubowaniu pozbawionych zdolności wytwarzania histydyny bakterii na podłożu mikrobiologicznym zawierającym ten aminokwas w ilości śladowej, pozwalającej na odbycie jedynie kilku podziałów komórkowych. Wykrywalny wzrost bakterii oznacza, że wada genetyczna powodująca niezdolność do wytwarzania histydyny została u nich naprawiona w wyniku mutacji powrotnej czyli rewersji mutacji. Bakterie, które jej uległy nazywane są rewertantami.

W teście Ames stosowane są najczęściej dwa różne szczepy *Salmonella typhimurium*: TA 98 i TA 100. Zastosowanie każdego z nich pozwala na wykrywanie mutacji punktowych innego typu: zmiany fazy odczytu (TA 98) i podstawiania par zasad (TA 100). Zmiana fazy odczytu jest konsekwencją wypadnięcia z nici DNA jednej pary nukleotydów. Powoduje to zmianę całego ciągu tripletów kodujących poszczególne aminokwasy budujące białko, a w konsekwencji zmianę składu tego białka. Podstawianie par zasad polega na zastąpieniu w podwójnej nici DNA pary nukleotydów AT parą CG. Konsekwencją takiej mutacji jest zmiana jednego tripletu kodującego jeden aminokwas. Powoduje to zmianę tego aminokwasu w białku.

Ksenobiotyki w organizmie ssaka (także człowieka) ulegają przemianom biochemicznym, katalizowanym głównie przez enzymy wytwarzane w wątrobie. W następstwie tych przemian może nastąpić detoksykacja ksenobiotyków. Zdarza się jednak, że substancja nie wykazująca bezpośrednio działania toksycznego ulega w organizmie przemianom metabolicznym do substancji toksycznej. Dotyczy to także genotoksyczności. Dlatego wyróżnia się dwie grupy mutagenów:

- mutageny bezpośrednie, które mają zdolność reagowania z DNA, a więc powodowania mutacji, w postaci takiej, w jakiej wniknęły do organizmu
- mutageny pośrednie (promutageny), które nie mają zdolności reagowania z DNA w postaci chemicznej w jakiej występowały w środowisku i wniknęły do organizmu; jednak w organizmie ulegają przemianom metabolicznym do związków bezpośrednio reagujących z DNA czyli powodujących powstawanie mutacji.

Klasycznym przykładem promutagenu może być benzo[a]piren ulegający przemianom enzymatycznym do mutagennego i kancerogennego 7,8-dihydrodiol-9,10-*trans*-epoksydu. Ulega on także utlenianiu do chinonów, z których powstają 6-fenoksyrodniki wchodzące w reakcje z DNA.

Aby w teście prowadzonym *in vitro* zasymulować warunki biochemiczne panujące w organizmie ssaka wprowadza się do podłoża na którym inkubowane są bakterie w obecności

badanej próbki frakcję mikrosomalną S9 otrzymywana najczęściej z wątroby szczurów. Uzyskanie w teście podwyższonej aktywności mutagennej po dodaniu tej frakcji (w stosunku do testu bez jej zastosowania) świadczy o obecności w badanej próbce związków o charakterze promutagennym [Maron i Ames 1983].

Zastosowanie w teście dwóch różnych szczepów *Salmonella typhimurium* (TA 98 i TA 100) pozwala na wykrycie dwóch różnych typów mutacji punktowych (zmiany fazy odczytu i podstawiania par zasad). Wykonanie testu w dwóch wariantach pozwala na wykrycie w badanej próbce mutagenów bezpośrednich (bez frakcji S9) i pośrednich (z frakcją S-9).

W praktyce test polega na ekspozycji bakterii testowych na mutagenne działanie badanej próbki oraz określeniu liczby rewertantów powstałych w czasie ekspozycji. Równocześnie z ekspozycją badanej próbki wykonuje się dwie kontrole: negatywną i pozytywną. Kontrola negatywna pozwala na określenie rewersji spontanicznej, czyli liczby mutantów powstających samorzutnie, bez dodania badanej próbki (mutacja jest zjawiskiem naturalnym, jest ona konsekwencją błędu w replikacji w DNA, obecność mutagenu nie jest warunkiem powstawania błędów a jedynie zwiększa ich częstotliwość). Kontrola pozytywna polega na ekspozycji testowych bakterii na działanie mutagenu kontrolnego w celu sprawdzenia ich wrażliwości.

Test może być obecnie wykonywany metodą tradycyjną, na płytkach Petriego ze zagaryzowanym podłożem Vogel-Bonnera (metoda płytkowa) albo niedawno opracowaną metodą mikropłytkową, w której stosowane są mikropłytki i podłoża mikrobiologiczne płynne. Zaletą testu mikropłytkowego jest ograniczenie zużycia materiałów, w tym drogich odczynników oraz próbek. Jest to szczególnie ważne w przypadkach, kiedy uzyskanie większej ilości próbek jest niemożliwe, trudne albo kosztowne.

W tradycyjnym teście Ames, w którym bakterie inkubuje się na zestalonym agarem podłożu Vogel-Bonnera w szalkach Petriego określenie liczby rewertantów polega na liczeniu kolonii rewertantów. W przypadku testu mikropłytkowego, bakterie inkubuje się na podłożu płynnym z dodatkiem indykatora kwasowości. Zmiana zabarwienia podłoża z fioletowego na żółte albo widoczny wzrost bakterii. W tym wypadku liczy się osobno dołki płytki do inkubacji, w których nastąpił wzrost rewerantantów (zmiana zabarwienia albo obecność kolonii) i w których wzrost nie nastąpił (brak kolonii i zmiany zabarwienia podłoża). Za mutagenne uznaje się próbki, które spowodowały co najmniej dwukrotny wzrost liczby rewertantów w stosunku do kontroli negatywnej.

Test rec-assay

Innym często stosowanym testem bakteryjnym jest test "rec-assay" (z ang. recombination - rekombinacja, assay - próba). Metoda ta polega na badaniu zwiększonego **działania letalnego** (śmiertelnego) związków mutagennych na komórki mutantów bakterii *Bacillus subtilis*. Mutanty te nie posiadają zdolności do reperowania uszkodzeń w DNA za pomocą **rekombinacji** (rec-), w przeciwieństwie do szczepu dzikiego (rec+). **Reperacja rekombinacyjna** jest jeszcze drugim (obok poznanych już: fotoreaktywacji, reperacji przez

wycinanie i SOS) metodą naprawy. Komórki pozbawione jej mają jednocześnie osłabione pozostałe systemy naprawcze, dlatego nawet stosunkowo niewielkie uszkodzenia DNA mogą powodować u nich zahamowanie wzrostu. A więc, w przeciwieństwie do testu Ames, w teście rec-assay badana substancja o właściwościach mutagennych nie powoduje mutacji w komórkach testowych, lecz degradację DNA, która hamuje dalszy wzrost (komórka nie potrafi naprawić uszkodzenia). Szczep dziki natomiast jest w stanie rosnąć, dopóki siła działania mutagenu nie przekroczy możliwości naprawczych komórek. Porównując długość linii wzrostu obu szczepów ocenia się właściwości mutagenne próbki. Test rec-assay jest czułym testem, szczególnie przydatnym do badania związków metali, na które test Ames jest mniej wrażliwy.

Zadanie 1. Badanie mutagennego działania chromu testem Ames

Materiały:

szczep *Salmonella typhimurium* TA 98,
płytki Petriego z podłożem minimalnym,
kolbki z top-agarom zawierającym śladowe ilości histydyny i biotyny,
bulion Oxoid,
bufor fosforanowy,
roztwór daunomycyny,
roztwór $K_2Cr_2O_7$ (50 mg/cm^3),
sterylne probówki,
pipety z końcówkami

Wykonanie:

1. Sporządzić następujące stężenia $K_2Cr_2O_7$: 50 mg/cm^3 , 5 mg/cm^3 , $0,5 \text{ mg/cm}^3$.
2. Do sterylnej probówki wlać $0,5 \text{ cm}^3$ buforu fosforanowego.
3. Za pomocą automatycznej mikropipety wprowadzić do probówki $0,1 \text{ cm}^3$ całocennej bulionowej hodowli szczepu TA 98.
4. Dodać $0,1 \text{ cm}^3$ związku badanego (jedno z trzech stężeń).
5. Probówkę umieścić w termostacie o temperaturze 37°C na 20 min. (preinkubacja).
6. Po inkubacji dodać 2 cm^3 top-agaru, szybko wymieszać a następnie wylać na płytkę Petriego z podłożem minimalnym i równomiernie rozprowadzić po powierzchni.
7. Postępując w sposób podany wyżej wykonać kontrolę pozytywną dodając zamiast związku badanego $0,1 \text{ cm}^3$ roztworu daunomycyny (uwaga związek silnie mutagenny - podaje prowadzący!).
8. Wykonać kontrolę mutacji spontanicznej postępując jak w pkt. 2, 3, 5, 6 (bez dodawania związku badanego).

9. Wszystkie próby wykonać w trzech powtórzeniach.
10. Płytki inkubować w temperaturze 37°C przez 48 h.
11. Po okresie inkubacji policzyć wyrosłe kolonie na wszystkich płytkach uśredniając powtórzenia.
12. Obliczyć współczynnik mutagenności M wg wzoru: $M=a-b/b$, gdzie:
 - M – współczynnik mutagenności
 - a – średnia liczba rewertantów na płytkach z próbką badaną
 - b – średnia liczba rewertantów na płytkach kontrolnych (rewersja spontaniczna)
13. Ocenic czy chrom Cr⁺⁶ ma właściwości mutagenne.

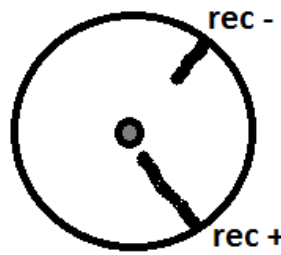
Zadanie 2. Badanie mutagennego działania chromu za pomocą testu Rec-assay.

Materiały:

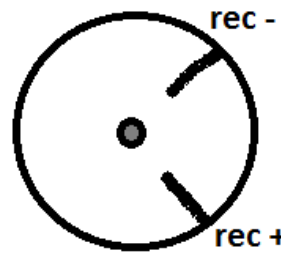
szczyepy *Bacillus*: H17 (Rec⁺) i M 45 (Rec⁻),
probówki z bulionem,
płytki Petriego z agarem odżywczym,
sterylne krążki bibułowe (16 mm średnicy),
pęsety,
denaturat,
roztwór K₂Cr₂O₇ (5 mg/cm³)

Wykonanie:

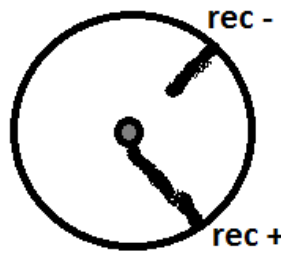
1. Za pomocą sterylnej pęsety umieścić krążek bibuły filtracyjnej na powierzchni płytki Petriego z agarem odżywczym, w odległości ok. 1 cm od brzegu płytki.
2. Pobrać esz *inoculum* z całonocnej hodowli bulionowej szczepu H17 i rozprowadzić w postaci pasma od brzegu krążka bibuły.
3. Podobnie posiać na tej samej płytce szczep M45, pod kątem ok. 90° względem poprzedniego posiewu.
4. Nanieść na krążek 2 krople roztworu K₂Cr₂O₇.
5. Inkubować 24 godziny w temperaturze 37°C.
6. Po zakończeniu inkubacji zmierzyć długość strefy zahamowania wzrostu obu szczepów (od brzegu krążka do początku wzrostu).
7. Porównać badany wzrost obu szczepów i ocenić czy badany związek ma właściwości mutagenne.
8. Badana substancja może być toksyczna i mutagenna, toksyczna ale niemutagenna, nietoksyczna ale mutagenna, nietoksyczna i niemutagenna (ryc.).



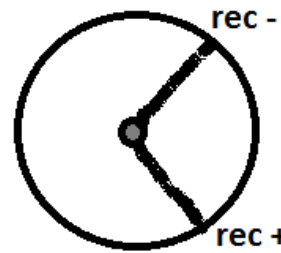
substancja toksyczna,
mutagenna



substancja toksyczna,
niemutagenna



substancja nietoksyczna,
mutagenna



substancja nietoksyczna,
niemutagenna

Ryc. . Możliwe wyniki testu "Rec-assay"