

Ames mutagenitási teszt

OECD 471 alapján

A *Salmonella* reverz mutációs teszt Bruce N. Ames és munkatársai által 1975-ben közölt módszer, ami kidolgozója nevének vált ismertté, és napjainkra a legáltalánosabban használt eljárás lett a *kémiai anyagok mutagenitásának kimutatására*.

Egyre szélesebb körben alkalmazzák a környezeti mintákból készített extraktumok tesztelésére is. A vizsgálati rendszer lehetőséget nyújt a **pontmutációk**, azaz a deléció, szubsztitúció, bázispárcserét okozó és a **frameshift mutagének** elkülönítésére, továbbá a metabolikus aktivációt nem igénylő **direkt mutagének**, és a nagyobb számú, metabolikus aktivációt igénylő **indirekt mutagének** elkülönítésére is.

A hisztidin-auxotróf törzsek mutáció hatására visszanyerik a hisztidin-mentes környezetbeni szaporodó-képességüket. → **Hisztidin-mentes agaron a *Salmonella* telepek megjelenése mutagén anyag jelenlétét jelzi.**

A teszt pozitív eredményt adó vegyi anyagok nem teljesen biztos, hogy az emlős mutagének, a relevancia 80% körüli.

Az Ames teszt lényege

A teszteléshez olyan tesztörzseket alkalmazunk, melyek hisztidin-operonja többféle változtatást hordoz emiatt ezek a törzsek nem képesek hisztidin szintézisére újabb mutáció vagyis reverz-mutáció nélkül. A reverz mutáció, és a mutációk általában kétféleképpen jöhetnek létre: spontán módon és vegyszerek által indukáltan. A teszt az indukált mutációs hatások mérésére szolgál.

A tesztörzsek a hisztidin-operon módosításán kívül olyan módosításokat tartalmaznak, amelyek megkönnyítik a his- auxotróf sejtek kisselektálását (pl. antibiotikum rezisztencia) és az érzékenységet (lipopoliszacharid réteg képzésének hiánya) is. Az érzékenységet növeli, hogy a törzsek DNS javító mechanizmusa hiányzik. Már a prokariótáknak is többféle DNS javító mechanizmusuk van, némely mechanizmus pontos, némely pontatlan, ez a mechanizmus megakadályozza a spontán kialakult mutációk rögzülését így gondoskodik a funkcióképes fehérje képződéséről.

Érzékenység a mutagén hatásokra

A hisztidin operon különböző pontjain az egyes törzsek különböző módosításokat (a hisD, hisG, hisC módosítás helye a hisztidin génjén) tartalmaznak, ezeket is mutációval idézték elő, majd a tesztben a mutagén hatásra ezek vissza mutálódnak (=revertálódnak), az eredeti módosítás azonban meghatározza azt is, hogy a törzs milyen típusú mutagén hatásra lesz érzékeny (pontmutáció, kereteltolódás).

A hisztidin operonon elvégzett módosítások helyei un. **hot spotok** olyan helyek, amelyek nem túl stabilak, gyenge pontok, így itt gyakori a mutáció, normális sejtnél a „beépített javító mechanizmus” itt gyakran dolgozik.

További érzékenységet növelő faktorokról a különböző tesztörzseknél lesz szó.

További érzékenység növelő faktorok, és a genotípus ellenőrzése

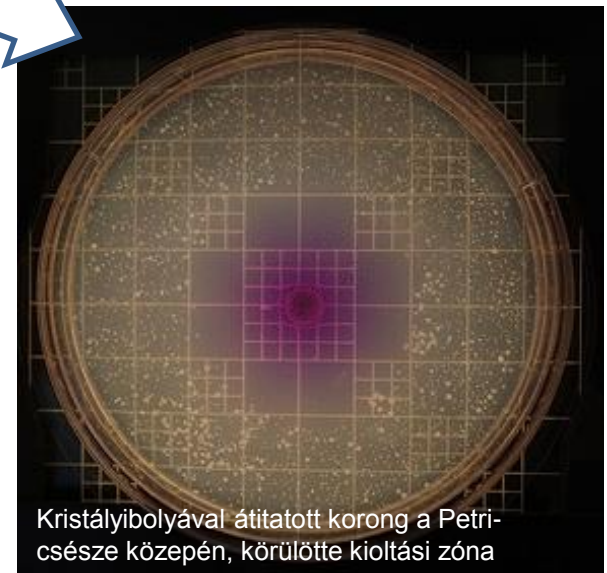
R-faktor jelenléte – a plazmidon lévő antibiotikum-rezisztencia génekkel ellenőrizhető:

pKM101 ampicillin,

pQA1 tetraciklin rezisztenciát hordoz

Rfa, LPS hiánya – külső, lipopoliszacharid réteg hiánya, a sejtbe így a nagyobb molekulák is be tudnak jutni, a lipopoliszacharid réteg hiányát kristályibolya oldattal lehet kimutatni, ha ugyanis a sejt nem rendelkezik az LPS réteggel a kristályibolya jelenlétében nem tud növekedni

UV érzékenység, a hibás szakaszt kivágó javító mechanizmus nem működik a sejtben, ez a javító mechanizmus az UV sugárzás okozta dimerizáció kivágására szolgál, megléte ellenőrizhető UV lámpával, 10 cm-ről 6 smp-át sugározzuk a sejteket



Kristályibolyával átitatott korong a Petri-csésze közepén, körülötte kioltási zóna

Salmonella tesztörzsek és tulajdonságaik

Törzs neve	Módosítást tartalmazó allél	Módosítás és célszekvencia	Reverz mutáció típusa, amelyre érzékeny	R-faktor: Plazmid
TA 1535	hisG46, rfa, uvrB	CTC (leucin)→GGG (prolin)	bázis-pár csere: tranzíció, transzverzió	-
TA 1537	hisD3076, rfa, uvrB	kereteltolódás (+ 1 bázis) CCC ismétlődő szakasz körül	kereteltolódás	-
TA 1538	his3052, rfa, uvrB	Kereteltolódás (-1 bázis) CGCGCGCG ismétlődő szakasz körül	kereteltolódás	-
TA 102	hisG428, rfa	CAAGTAAGAGC	A:T bázis-pár csere, cross-linking (keresztkötés),	pKM101, pAQ1
TA 97	hisD6610, rfa, uvrB	CCCCC	kereteltolódás	pKM101
TA 98	hisD3052, rfa, uvrB	CGCGCGCG	kereteltolódás	pKM101
TA 100	hisG46, rfa, uvrB	CCC	bázis-pár csere	pKM101

Metabolikus aktiváció

Számos potenciális mutagén anyag csak az emlősök májában, metabolizmus során lesz rákkeltő vagy mutagén, mint például a PCB-k (poliklórozott bifenilek) és a PAH-ok (poliaromás szénhidrogének).

Kimutatásuk **S9 mix**-szel történik, főbb komponensei:

S9 – aktivált patkánymáj poszt mitokondriális frakciója, az aktiváció Aroclor 1254-el (PCB keverék) vagy phenobarbitonnal és β -naphthoflavonnal; a mixben 5-30%-os koncentrációban alkalmazható, a tesztelendő vegyület koncentrációjától függően, de érdemes alkalmazni több koncentrációban is

Glükóz-6 –foszfát

NADP

Azo és diazo vegyületeknél redukzív metabolikus aktivációt kell alkalmazni [2,3]

Előzetes tudnivalók a laboratóriumi munkához

- antibakteriális hatású vegyületek tesztelésére nem alkalmas
- szilárd halmazállapotú vegyi anyagoknál az oldószert vagy hordozóanyagot külön is tesztelni kell toxicitása vagy mutagén hatása miatt
- illékony anyagok tesztelése [1], például exszikkátorban, vagy más légmentesen zárható, kontrollált térben történjen
- toxikus vegyületeket kellően kis koncentrációban alkalmazzunk
- többféle tesztörzset használjunk, legalább 3, különböző érzékenységűt
- metabolikus aktiváció is alkalmazható a tesztben
- **ne feledjük, hogy mutagén és karcinogén anyagokkal dolgozunk, ügyeljünk az ilyenkor szokásos munkavédelmi rendszabályok betartására és a védőeszközök használatára!**

Előkészületek

Inokulumkészítés

14-18 órás 37°C-on inkubált, 100 rpm-mel rázatott tenyészet szükséges, a végső sejtkoncentráció kb. 10^9 elő sejt/ml

Teszt-vegyület koncentrációja

5 mg/L-5 mikrog/L, kb. 10-szeres léptékű koncentrációsort érdemes készíteni a kezdeti kísérletekhez, tájékozódjunk a vegyi anyag citotoxikus koncentrációjáról is

Tápoldatok elkészítése Id. dokumentum végén

Kísérlettervezés

A tesztel egy időben végezendő pozitív és negatív kontrollokkal számolni kell, ellenőriznünk kell a **tesztörzsek genotípusát**, metabolikus aktiváció esetén pozitív kontrollal **az enzimek aktivitását**, ha valamilyen **oldószert** vagy vivőanyagot használunk annak a mutagenitását vagy toxicitását is. Meg kell határoznunk **a spontán revertánsok számát** (a mutáció természetes gyakoriságát), hiszen az eredmények értékelésekor ehhez képest állapítjuk meg a mutagén hatás meglétét.

Kontrollok – a teszttel párhuzamosan végezendő

Chemical and CAS No.		Strain
(a)	Sodium azide [CAS no. 26628-22-8]	TA1535 and TA100
(b)	2-Nitrofluorene [CAS no. 607-57-8]	TA98
(c)	9-Aminoacridine [CAS no. 90-45-9] or ICR191 [CAS no. 17070-45-0]	TA1537, TA97 and TA97a
(d)	Cumene hydroperoxide [CAS no. 80-15-9]	TA102
(e)	Mitomycin C [CAS no. 50-07-7]	WP2 <u>uvrA</u> and TA102
(f)	N-Ethyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine [CAS no. 70-25-7] or 4-nitroquinoline 1-oxide [CAS no. 56-57-5]	WP2, WP2 <u>uvrA</u> and WP2 <u>uvrA</u> (pKM101)
(g)	Furylfuramide (AF-2) [CAS no. 3688-53-7]	plasmid-containing strains

**pozitív kontroll
vegyületek**
Metabolikus aktiváció
nélküli teszthez [5]

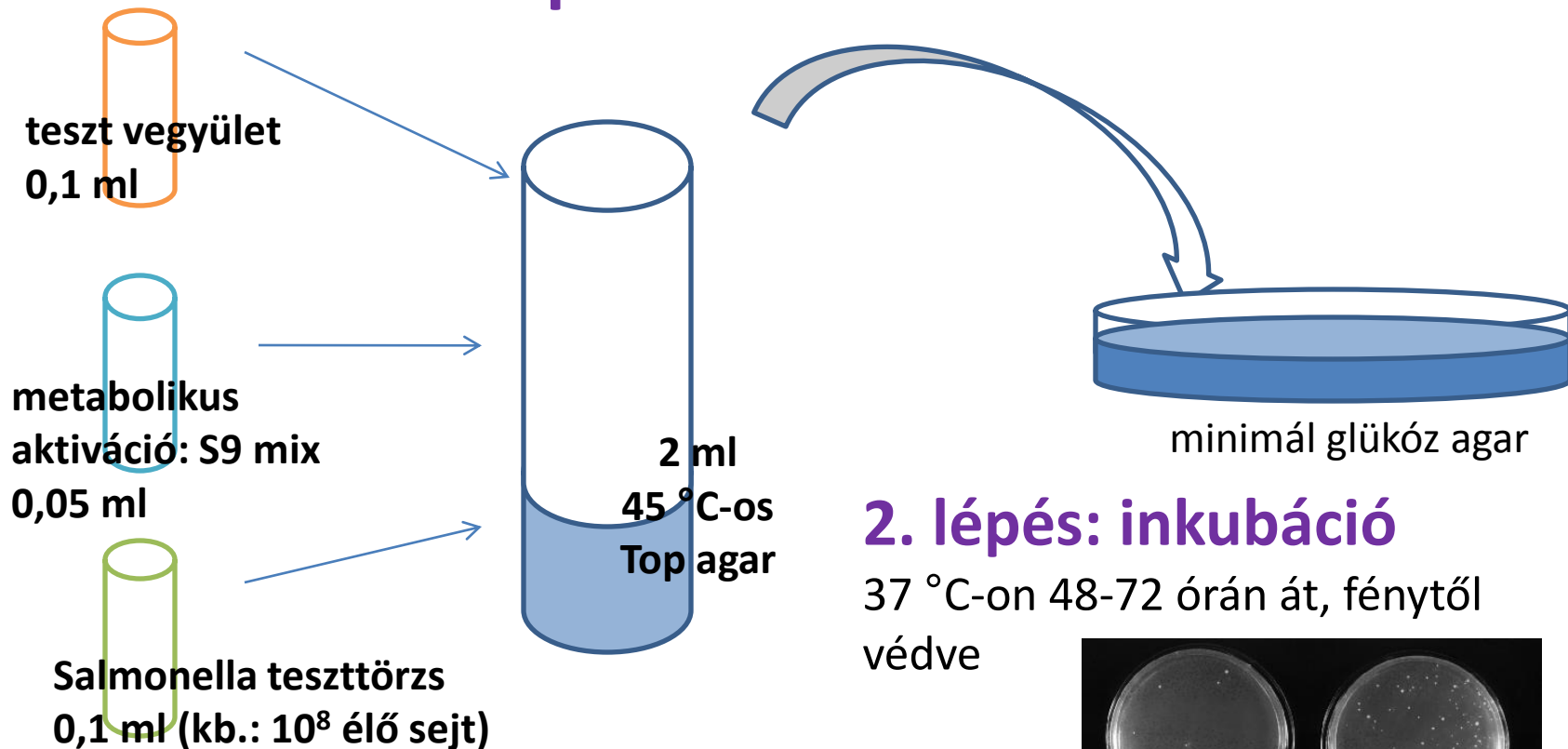
Chemical and CAS No.
9,10-Dimethylanthracene [CAS no. 781-43-1]
7,12-Dimethylbenzanthracene [CAS no. 57-97-6]
Congo Red [CAS no. 573-58-0] (for the reductive metabolic activation method)
Benzo(a)pyrene [CAS no. 50-32-8]
Cyclophosphamide (monohydrate) [CAS no. 50-18-0 (CAS no. 6055-19-2)]
2-Aminoanthracene [CAS no. 613-13-8]

**pozitív
kontroll
vegyületek**
Metabolikus
aktiváció
esetén[5]

- spontán revertánsok számának meghatározása (10-30 közötti/ Petri-csésze)
- oldatok esetében az oldószer tesztelése **negatív kontrollok**
- sterilitás ellenőrzése

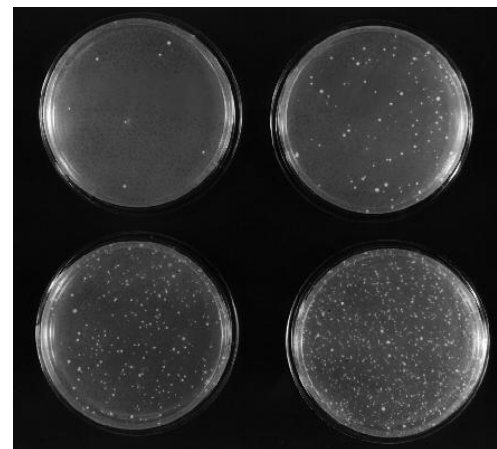
Ames teszt menete

1. lépés: lemezöntés



2. lépés: inkubáció

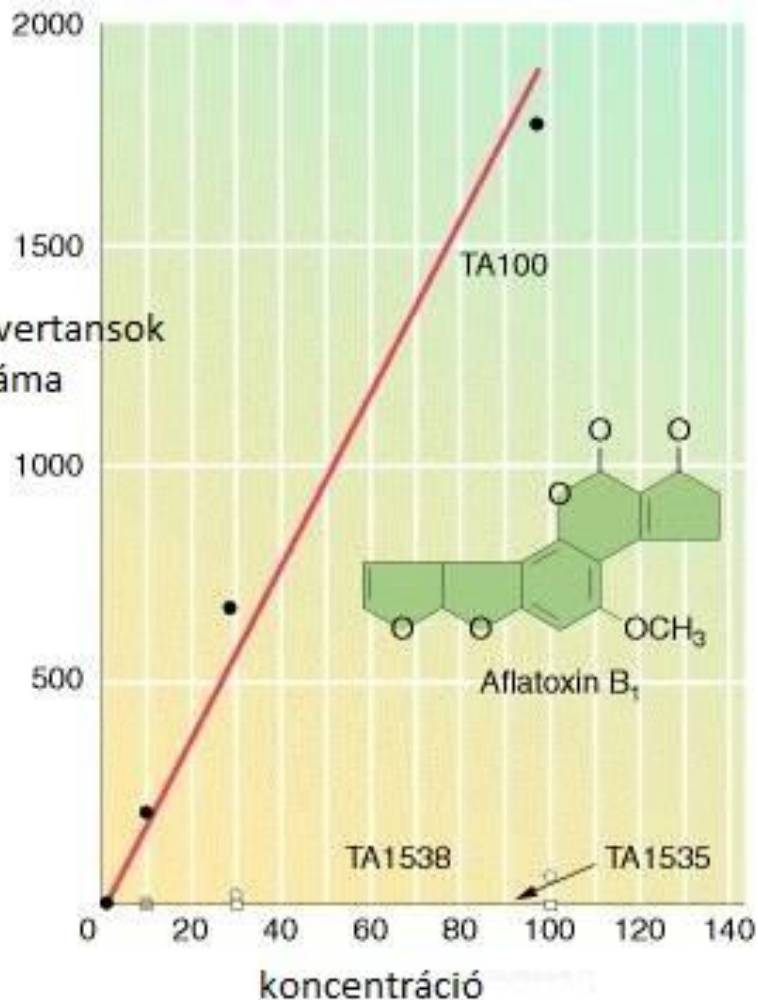
37 °C-on 48-72 órán át, fénytől védve



3. lépés: telepszámlálás — az inkubációs idő letelte után megszámloljuk a kinőtt telepeket

Ames teszt menete

4. lépés: eredmények értékelése



Egy vegyi anyagot akkor mondhatunk **mutagén**nek, ha a koncentrációjának függvényében növekszik a revertánsok száma és ez megismételhető.

Gyenge mutagénnek mondjuk, ha koncentráció-válasz összefüggés jelen van, de a kapott revertánsok száma nem több mint a háttérre kapott revertánsok száma.

Nem mutagén egy vegyi anyag, ha két független kísérletben sem volt koncentráció-válasz összefüggés, és a kapott revertánsok száma kevesebb, mint a háttér kétszerese.

Nem eldönthető a mutagén hatás, ha nincs dózis-válasz összefüggés, viszont előfordul, hogy a revertánsok száma több mint a háttér kétszerese. Ekkor további vizsgálatok szükségesek, érdemes megnézni kísérlet körülményeit, a vegyület formáját, hozzáférhetőségét [4,5]

Tápanyagok elkészítése [4]

Minimál glükóz agarlemez készítése

Összetevők 1000 ml-re számítva:

- 914 ml desztillált víz
- 17 g agar
- 20 ml 50X Vogel-Bonner sóoldat
- 50 ml 40 %-os glükóz oldat

Elkészítjük az agart a desztillált vízzel és sterilizáljuk. Az 50X Vogel-Bonner sóoldatot, a 40%-os glükóz oldatot külön sterilizáljuk, és a Petri-csészére való kiöntés előtt adjuk hozzá a forró, de nem 100°C-os agarhoz.

Ügyeljünk a sorrendre (1. 50X V-B sóoldat, 2. 40%-os glükóz oldat)!

Ezután ha megszilárdul az agar már nem lehet visszolvastani, mert a glükóz bomlásnak indul és az agar megbarnul.

His/bio oldat

Sterilszűrt hisztidin és biotin oldatokból állítjuk össze a teszt előtt. Steril kémcsőbe mérjük össze 10 ml biotin és 100 µl hisztidin oldatot és vortexszel összekeverem.

Biotin oldat 25 ml-hez

3,1 mg biotint analitikai mérlegen bemérünk egy 25 ml-es mérőlombikba, jelig töltjük desztillált vízzel, rázogatással segítjük az oldódást és steriliszűrjük. Felhasználásig hűtőben tartjuk.

Hisztidin oldat 25 ml-hez

0,5 g hisztidint analitikai mérlegen bemérünk egy 25 ml-es mérőlombikba, jelig töltjük desztillált vízzel és steriliszűrjük. Felhasználásig hűtőben tartjuk.

A hisztidin és a biotin is hőérzékeny (max.: 60°C)!

Nutrient tápanyag 13 g/liter

Top agar

0,6 % agar és 0,5 % NaCl-ot tartalmaz, sterilizálás után 10 ml His/Bio oldatot adunk 100 ml top agarhoz

50X Vogel-Bonner sóoldat

- 670 ml desztillált víz
- 10 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
- 100 g Citromsav monohidrát
- 500 g K_2HPO_4
- 175 g $NaH_2NH_4 PO_4 \cdot 4H_2O$

A készítésnél a sókat ebben a sorrendben adjuk a desztillált vízhez folyamatos kevergetés és óvatos melegítés mellett.

S9 mix 50 ml

- 2-5 ml S9
- 1 ml $MgCl_2$ -KCl oldat
- 0,25 M-os glükóz-6-foszfát oldat
- 2 ml 0,1 M-os NADP
- 25 ml 0,2 M-os foszfát puffer pH 7.4

50 ml-re kiegészítjük steril desztillált vízzel

$MgCl_2$ -KCl oldat 500 ml

- 61,5 g KCl
- 40,7 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$

1 M-os glükóz-6-foszfát oldat 2,82 g/10 ml desztillált víz

0,2 M-os foszfát puffer pH 7.4

- 60 ml 0,2 M-os 0,2 M-os $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ (13,6 g/500 ml)
- 440 ml 0,2 M-os Na_2HPO_4 (14,2 g/500 ml)

NADP oldat 383 mg NADP/5 ml desztillált víz

Ampicillin oldat ampicillin trihidrát 0,8 g/ 100 ml 0,02 M-os NaOH

Tetraciklin oldat 8 mg tetraciklin/ 1 ml 0,02 M-os HCl

Kristályibolya oldat 0,1 g/100 ml

Irodalomjegyzék

- 1 Araki, A., Noguchi, T., Kato, F. and T. Matsushima: Improved Method for Mutagenicity Testing of Gaseous Compounds by Using a Gas Sampling Bag. *Mutation Research*, 307(1994).335-344.
- 2 Matsushima, M., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A., and Sawamura, M. (1980). Factors Modulating Mutagenicity Microbial Tests. In: Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens. Ed. Norpoth K.H. and Garner, R.C., Springer, Berlin-Heidelberg-New York. pp. 273-285.
- 3 Prival, M.J., Bell, S.J., Mitchell, V.D., Reipert, M.D. and Vaughn, V.L.: Mutagenicity of Benzidine and Benzidine-Congener Dyes and Selected Monoazo Dyes in a Modified Salmonella Assay. *Mutation Research*, 136 (1984). 33-47.
- 4 Dorothy M., Maron Bruce N. Ames: Revised methods for the Salmonella mutagenicity test *Mutation Research*, 113 (1983) 173-215
- 5 OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS Bacterial Reverse Mutation Test 471