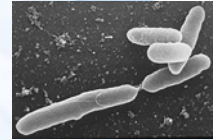


Experimentální a aplikovaná toxikologie a ekotoxikologie
Mikrobiální testy – Testy toxicity a genotoxicity s destruenty

2019



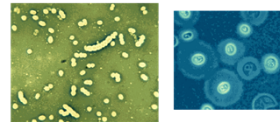
Pavel Čupr
 pavel.cupr@recetox.muni.cz

Procaryotes

- ◆ DNA is not in a membrane; is a circular chromosome.
- ◆ Lack other membrane-enclosed organelles.
- ◆ DNA is not associated with histone proteins.
- ◆ Cell walls contain peptidoglycan.

Special stains

- ◆ Capsule stain

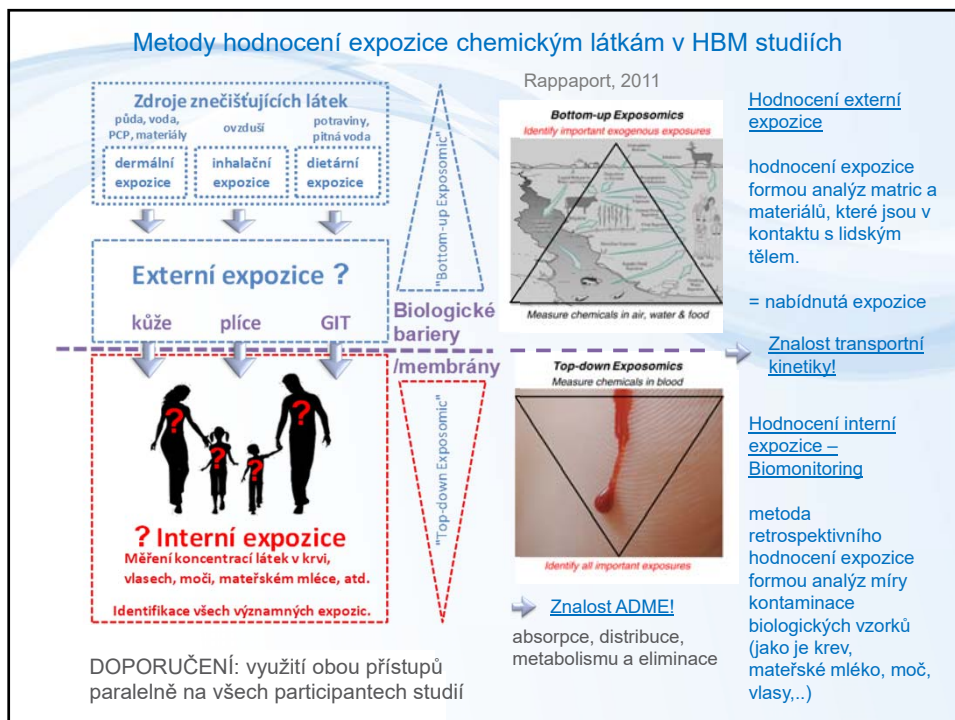
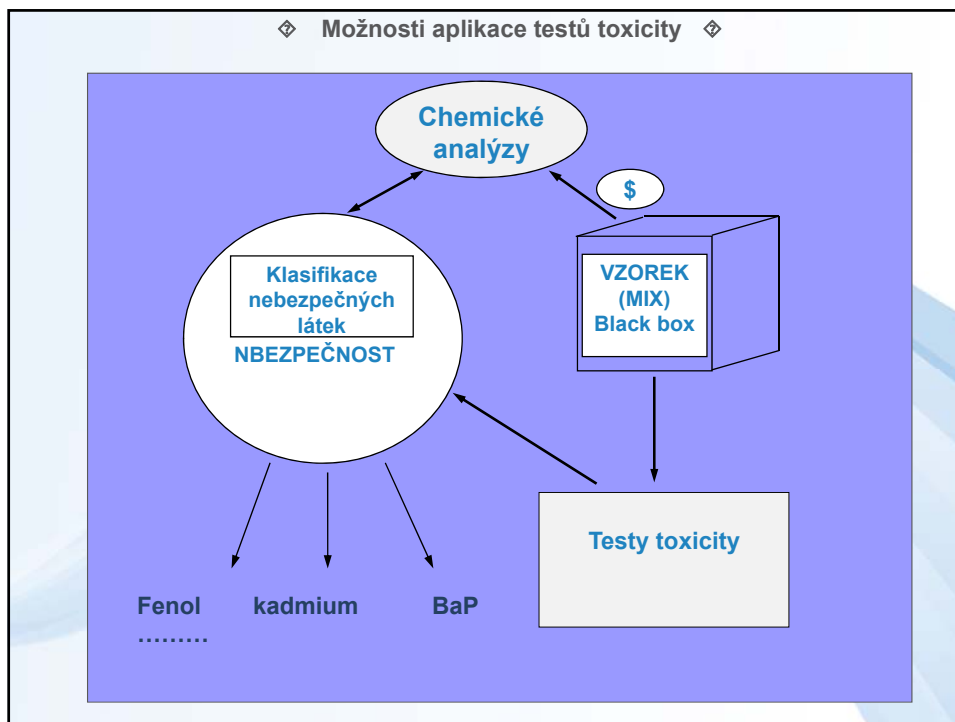


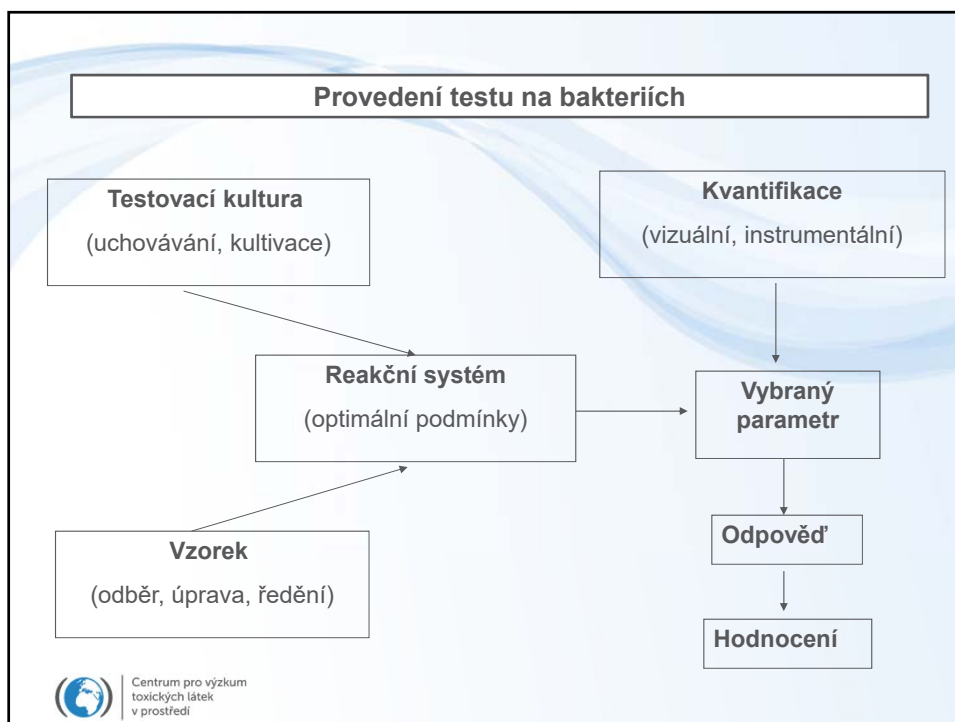
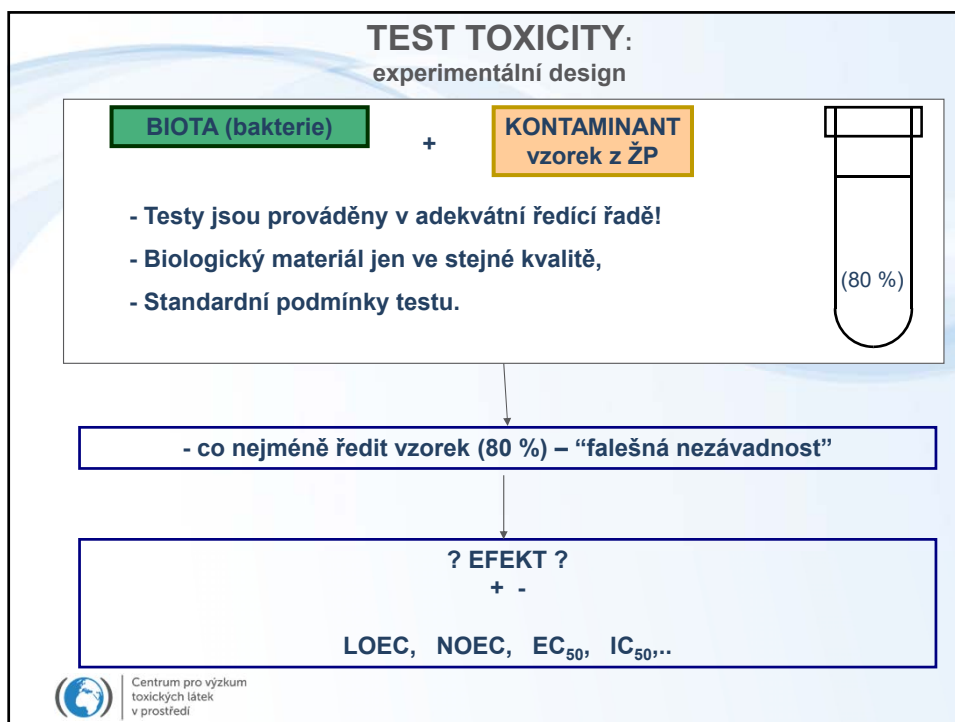
Shapes of Procaryotes

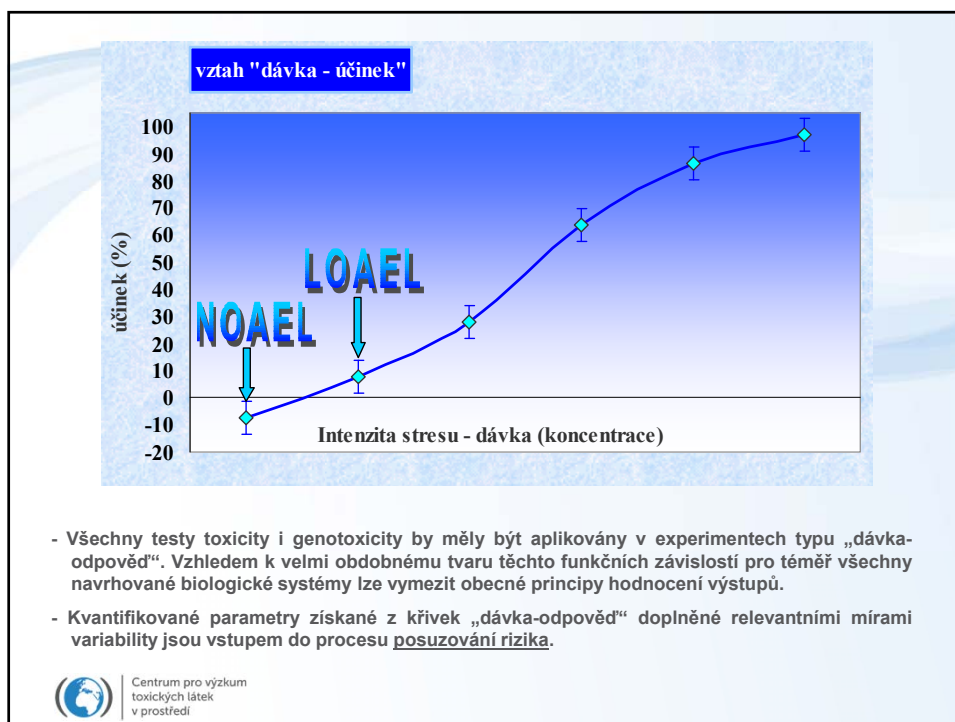
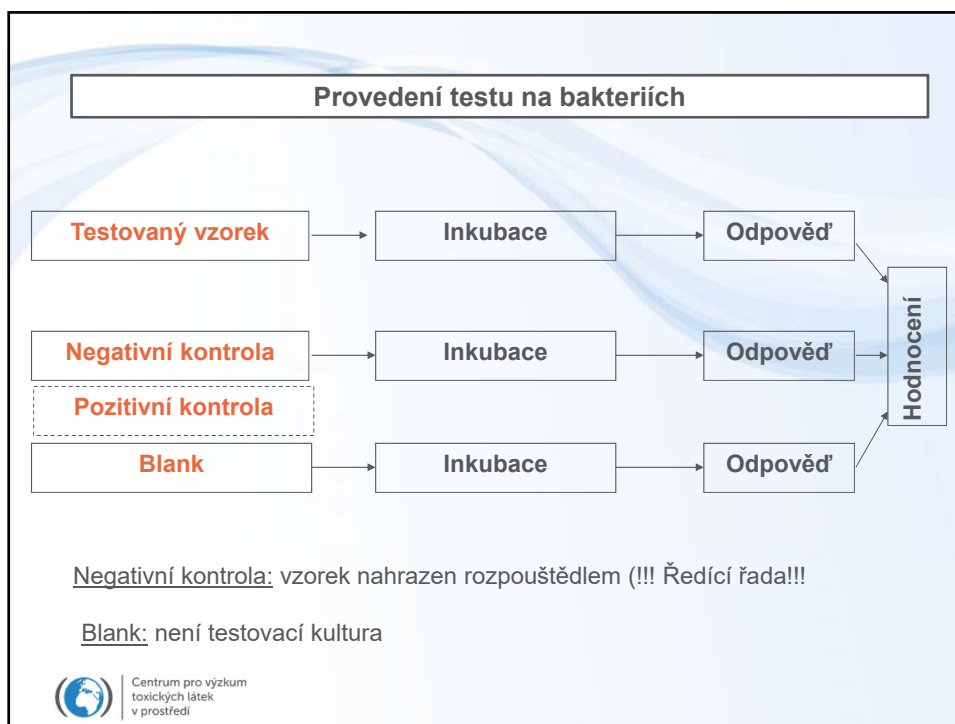
- ◆ Cocci: round
 - diplococci ●●
 - streptococci ●●●●
 - tetrads-groups of 4 ●●●●
- ◆ Rods: coccobacilli —
- ◆ Spiral: vibrios, spirilla, spirochetes
 - ~ ~ ~ ~
- ◆ Star-shaped, square flat cells, triangular

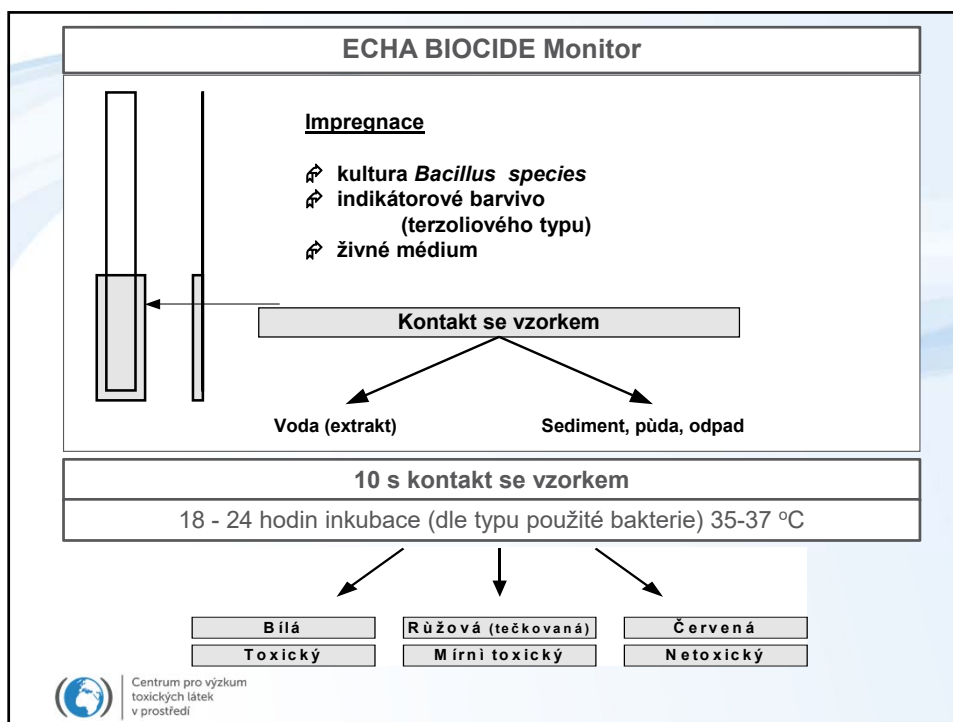
Procaryotes

- ◆ Size
 - 0.2 to 2.0 μm in diameter
 - 2 to 8 μm in length









ECHA BIOCIDES Monitor

ECHA Biocide Monitor II.	
Organismus	Bakterie – rodu <i>Bacillus</i> (G+).
Princip	Test je založen na použití malého absorpčního papírku, který je impregnován testovacím organismem a indikátorovým barvivem bakteriálního růstu (tetrazoliová sůl). Barvivo se redukuje v závislosti na koncentraci dehydrogenáz, které produkují přítomné bakterie. <u>Vývinutá barva se interpretuje podle přiložené stupnice: toxický vzorek - bílá, růžová nebo tečkovaná - jako mírně toxický, červená - netoxický.</u> (Dutka a Gorrie 1989).
Trvání testu	Kontakt systému se vzorkem 10 sekund + 18-24 hodinová kultivace až do vytvoření barvy na proužku s kontrolním vzorkem.
Teplota	35 – 37 °C.

Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí

GIT – růstově inhibiční test (EN ISO 10712, ČSN 75 7730)

Turbidimetrický test – EN ISO 10712, ČSN 75 7730

Organismus	<i>Pseudomonas putida</i> (případně <i>fluorescens</i>) G-.
Princip	Principem tohoto testu je kultivace bakteriálního inokula v tekuté živné půdě se vzorkem. Se zvyšující se rychlostí růstu vzniká intenzivnější zákal. Průběh testu se sleduje měřením tohoto zákalu turbidimetricky (Dutka et Kwan, 1982). 18 hodinové bakteriální inokulum se naředí na požadovanou hustotu a nasazuje se do testovaných vzorků a kontrol ve zkumavkách. Po 16 hodinové kultivaci v termostatu se měří absorbance při 560 nm a vypočte se % inhibice mikrobiálního růstu ve srovnání s kontrolou. (Alternativní λ je 650 nm, která je optimální pro <i>Pseudomonas fluorescens</i>) (Dočkal et Soldán, 1988).
Reakční směs (V)	100 ml dle ČSN, případně nižší.
Předkultivace	18 hodin.
Trvání testu	16 ± 1 hodin (6).
Teplota	23 ± 1 °C.
Třepání	Urychluje průběh testu (není podmínkou).
Pozitivní kontrola	3, 5 – dichlorfenol.
Aseptická práce	Velmi limitující pouze při zakládání testu a při uchování kultury.
Doporučení	Finančně velmi výhodný test. Vhodný k testování odpadů – toxických vzorků bez vysokého zákalu a zbarvení.

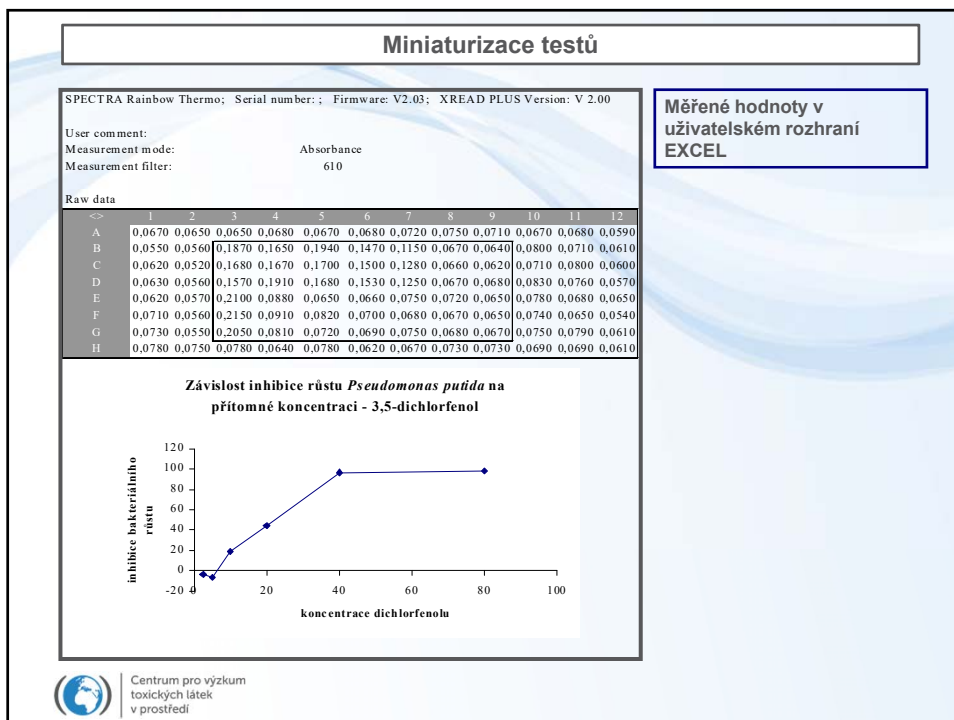
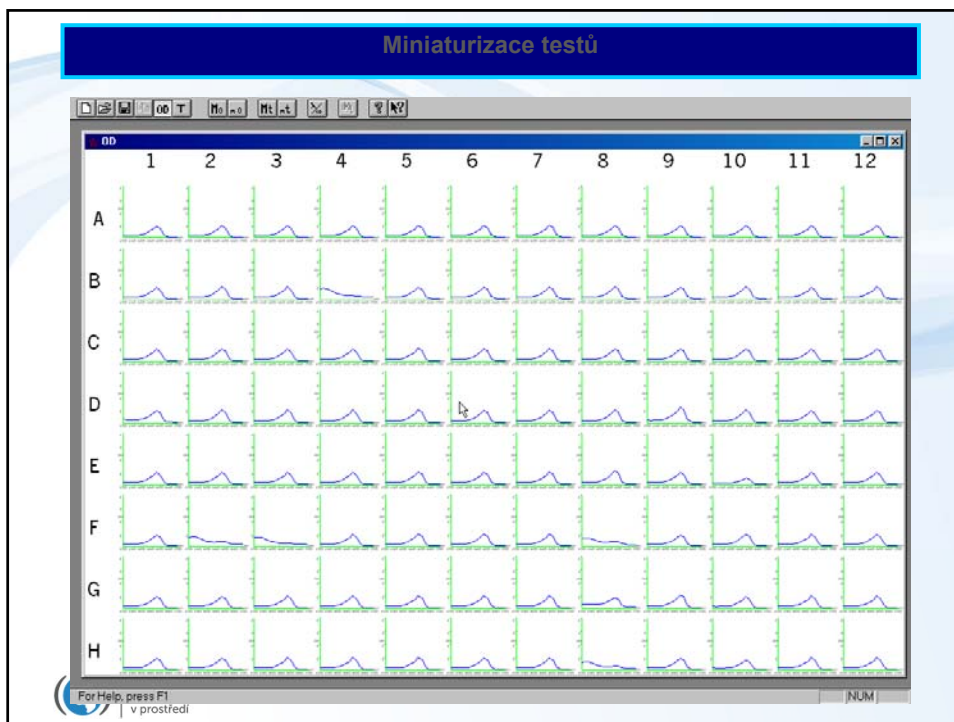


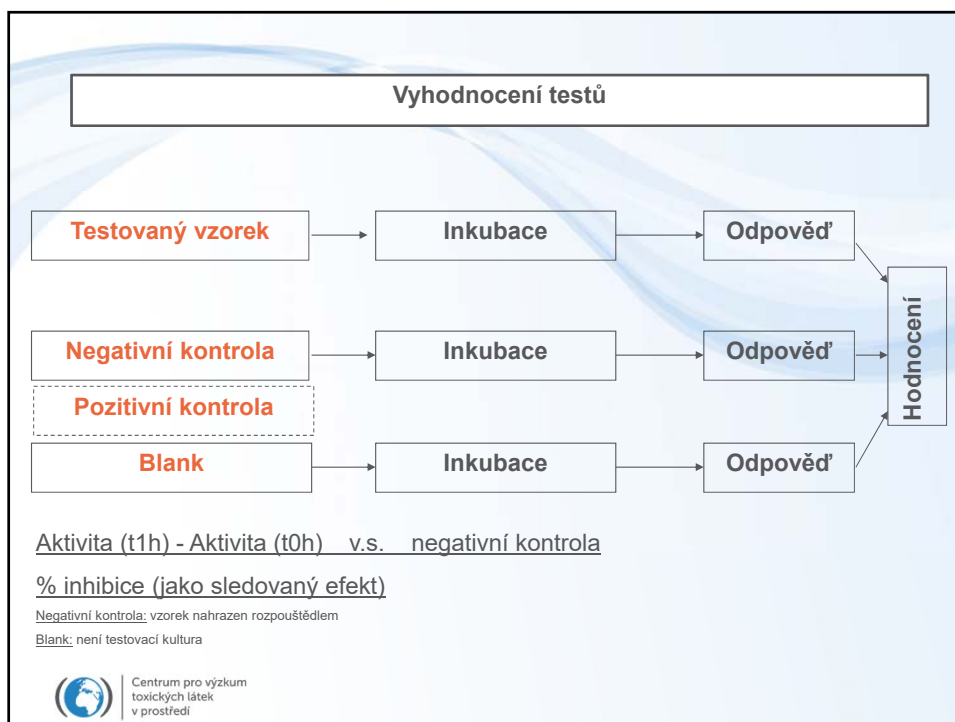
Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Miniaturizace testů

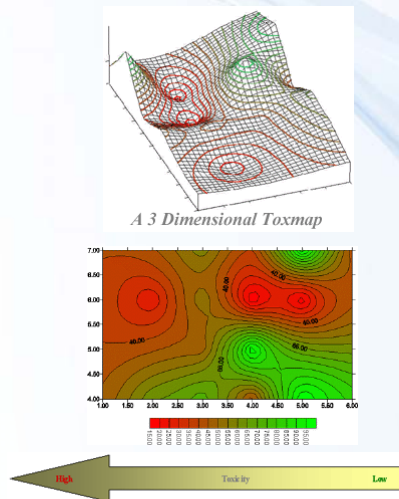


Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí





Screeningové testy toxicity - aplikace testů na prokaryotických mikroorganismech

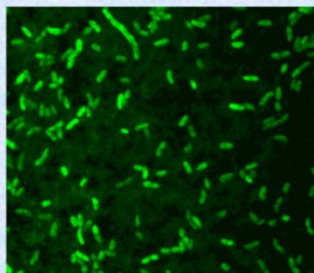


Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

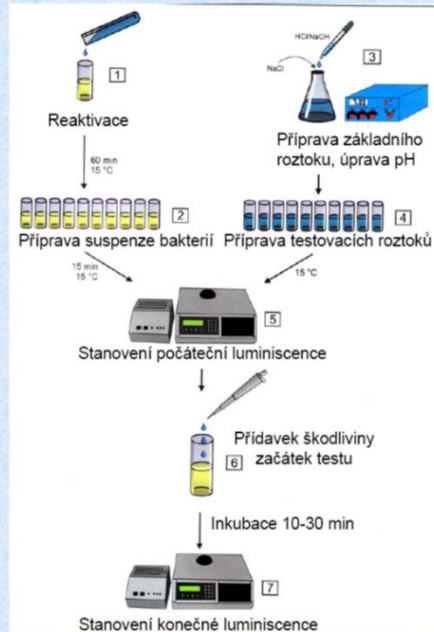
MICROTOX

MICROTOX - Akutní test toxicity (BioFix® Lumi)

Salinní bakterie *Vibrio fischeri*
vykazující bioluminiscenci



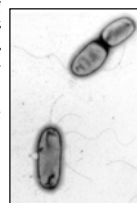
- redukce intenzity bioluminiscence vlivem působení škodliviny
- vzorky: chemikálie, jejich směsi, odpadní vody, extrakty sedimentů a půd
- dobře reprodukovatelný



MICROTOX

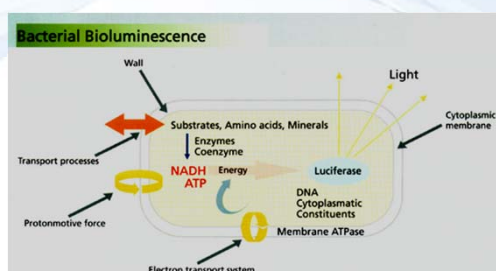
Microtox

Organismus	<i>Vibrio fischeri</i> (G-)
Princip	Jsou to testy na mořské luminiscenční bakterii <i>Vibrio fischeri</i> (ISO 11348 1998). Po proběhlé expozici je měřeným parametrem inhibice bioluminiscence. Kinetika inhibice je nejčastěji sledována v následujících expozičních intervalech: 5, 15 a 30 minut s použitím jemné ředící řady vzorku 1:1. Vzorky by měly být před měřením upravovány: pH, salinita (2 ‰). Je-li hodnota pH v rozmezí od 6 - 8,5, není nutné pH upravovat (BioOrbit 1996). Při úpravě pH je nutné citlivě připravit roztok HCl či NaOH o takové koncentraci, která optimálně upraví pH roztoku co nejmenším objemem – tím lze zabránit nežádoucímu naředění vzorku. Celý test probíhá při teplotě 15 °C. Test má také variantu "solid phase".
Reakční směs (V)	1 ml. Poměr vzorek:inokulum je 500:500 µl, případně i 800:200 µl.
Předkultivace	10 – 15 minutová resuscitace lyofilizované bakterie (15 °C).
Trvání testu	5, 10, 15, 20, 30 minut. Sleduje se jen jeden endpoint, nebo kinetická odpověď bakterie v několika zvolených intervalech.
Teplota	15 °C.
pH	Optimum 6 – 8,5 pH.
Třepání	Ne.
Pozitivní kontrola	ZnSO ₄ .
Aseptická práce	Není nutná.



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

MICROTOX



-Emise světla je silně exergonický proces.

-Celkový kvantový výtěžek bioluminiscence, tj. počet kvant vyzářených na jednu molekulu spotřebovaného substrátu, činí asi 0,1.

-Bioluminiscenční systém je vlastně boční větví elektronů ve flavoproteinové části aerobního respiračního řetězce.



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

MICROTOX

ČSN EN ISO 11348-(1)

Název normy:

Jakost vod - Stanovení inhibičního účinku vzorků vod na světelnou emisi *Vibrio fischeri* (Zkouška na luminiscenčních bakteriích) - Část 1: Metoda s čerstvě připravenými bakteriemi,

Třídící znak: 757734

Vydána: leden 2000



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Mutatox

Mutatox	
Organismus	Využívání bakterie <i>Vibrio fischeri</i> - „dark mutant“ - za normálních podmínek neluminuje (G-).
Princip	Jedná se o mutanta, u kterého je emise světla způsobena až reverzní mutací za přítomnosti mutagenních látek. (Ulitzur et al. 1980). Lyofilizované bakterie jsou rehydratovány a exponovány toxickou látkou. Po 16-24 hodinách se měří emise světla luminometrem. Test je prováděn s i bez enzymové aktivace S9. Použití +S9 je popsáno v práci Johnson 1992, aplikace bez -S9 v článku Kwan et al. 1990.
Reakční směs (V)	500 µl.
Předkultivace	30 minut v 37 °C vodní lázni.
Trvání testu	16 – 24 h.
Citlivost	Dodání S9 směsi má tendenci zvýšit detekční limit a snížit jednotnost výsledků, což může být vysvětleno nestandardními podmínkami pro metabolizaci (bakterie vyžaduje jen 15 °C, zatímco S9 směs byla vyvinuta pro Ames test při 37° C). S výsledky Mutatoxu také může interferovat cytotoxicita (stejný případ i u Ames testu). Zde se však může provést jako kontrola populačně růstový test založený na buněčné hustotě. (Willemsen et al. 1995). Byla potvrzena vysoká 93 % shoda s Ames testem (Legault et al. 1994). Mutatox byl schopen z 82% správně odlišit (ne)karcinogenní látky ve srovnání s Ames testem, který měl tuto schopnost nižší (73%).
Teplota	23 ± 1 °C.
Třepání	Ne.
Pozitivní kontrola	2-AA, 2-AF, BaP..
Aseptická práce	Ano.
Doporučení	Test je doporučen provádět v kombinaci s Microtox testem, který mu musí předcházet (Hauser et al. 1997).



ATP – TOX system

- ATP-TOX system využívá měření aktivity buněčné ATP jako indikátoru růstové inhibice.
- **Adenosin trifosfát je velmi důležitá, vysoce energetická sloučenina, kterou syntetizují živé organismy v buňkách pro ukládání lehce přenosné energie. Ta je využívána v buňkách v místě aktuální potřeby. Pokud buňka začne z jakýchkoliv důvodů snižovat intenzitu metabolismu, lze citlivě pozorovat snížení tvorby ATP (aniž by došlo k úplnému odumření buňky).**
- Základní test pro měření ATP je založen na měření světelné luminiscence, která následuje po reakci luciferinu s ATP za přítomnosti luciferázy a hořčičných iontů. Tento systém může být využit pro měření jakékoliv bakterie nebo řasy, která rychle roste v laboratorních podmínkách:

luciferáza

- luciferin + ATP + O₂ -----> oxyluciferin + AMP + PPi + CO₂ + světlo (~562 nm)

Mg²⁺

- 18-24 hodinová buněčná kultura se naředí na potřebnou hustotu a přidá se k jednotlivým koncentracím testovaného vzorku. Zkumavky se inkubují na rotační třepačce po dobu 5 hodin a po té se měří celkové množství vyprodukované ATP pomocí luciferin-luciferázové aktivity (dodává se luciferin-luciferázový roztok do testované směsi) na luminometru. Vzorek může inhibovat schopnost přidané luciferázy měřit produkci ATP, proto je třeba ještě ověřit, zda tento jev nenastal. Celý postup měření je stejný jako u ATP, ale místo bakteriální kultury se používá sterilní médium stejného obsahu, jako je v bakteriálním inokulu. Testování vzorků, které způsobují vyšší inhibici luciferázové aktivity, by mělo být zopakováno s podrobnějším ředěním.



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

ATP – TOX system

Extrakce ATP

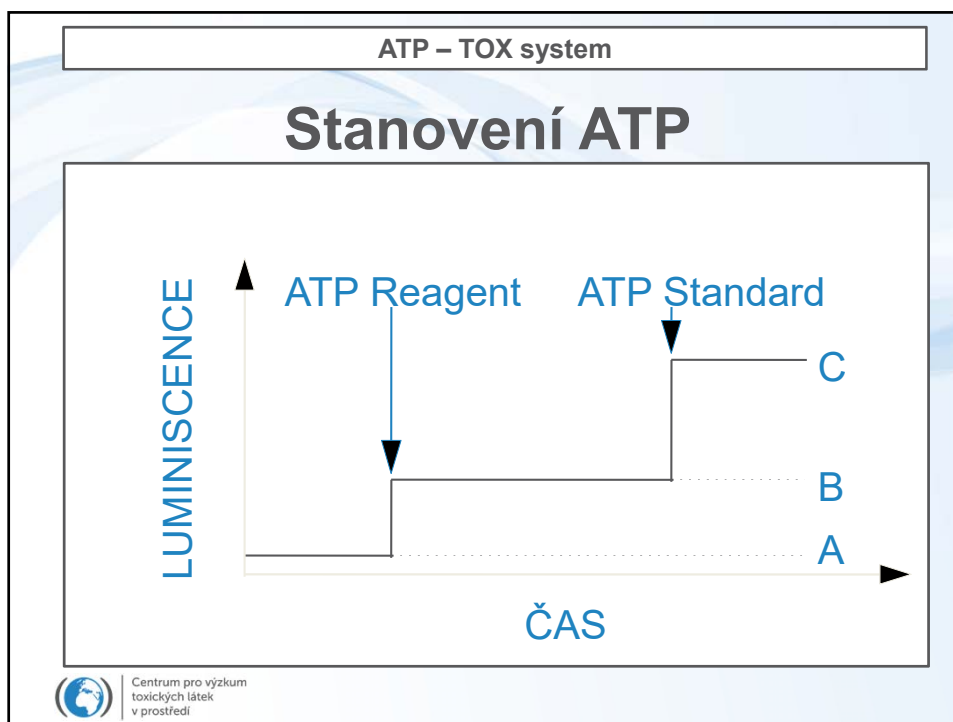
= „rozbití“ buněčné stěny a uvolnění buněčného obsahu včetně ATP

extrakční činidla: TCA, H₂SO₄, detergent - benzethonium chlorid, DMSO...

možná inhibice luciferázy extrakčním činidlem ---> nutné ředění (TCA) nebo neutralizace (benzethonium chlorid, H₂SO₄)



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí



ATP – TOX system

ATP-TOX systém	
Organismus	Libovolná kultura.
Princip	ATP-TOX systém využívá měření aktivity buněčné ATP jako indikátoru růstové inhibice. Základní test pro měření ATP je založen na měření světelné luminescence, která následuje po reakci luciferinu s ATP za přítomnosti luciferázy a hořčičných iontů. Tento systém může být využit pro měření jakékoliv bakterie nebo řasy, která rychle roste v laboratorních podmínkách (Dutka 1988). Zkumavky se inkubují na rotační třepačce po dobu 5 hodin a po té se měří celkové množství vyprodukované ATP pomocí luciferin-luciferázové aktivity (dodává se luciferin-luciferázový roztok do testované směsi) na luminometru. Vzorek může inhibovat schopnost přidané luciferázy měřit produkci ATP, proto je třeba ještě ověřit, zda tento jev nenastal..
Reakční směs (V)	1 ml. (200 ul roztoku enzymu + 800 ul vzorku)
Předkultivace	Závisí na typu kultivovaných buněk (18-24)
Trvání testu	Po proběhlé expozici se provede rozrušení stěn buněk (čínidlem – TCA, trichloroctová kyselina, sono – ultrazvuk). Tím dojde k uvolnění ATP do roztoku, ze kterého se odebírá 800 ul vzorku do reakční směsi.
Teplota	Závislá na vybrané kultuře.
Třepání	Doporučené.
Pozitivní kontrola	Chemické látky musí být vybírány s ohledem na možnou inaktivaci enzymu (viz princip).
Aseptická práce	Ano

Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

ATP – TOX system

Automatický BIOSENZOR



Swab



Twist



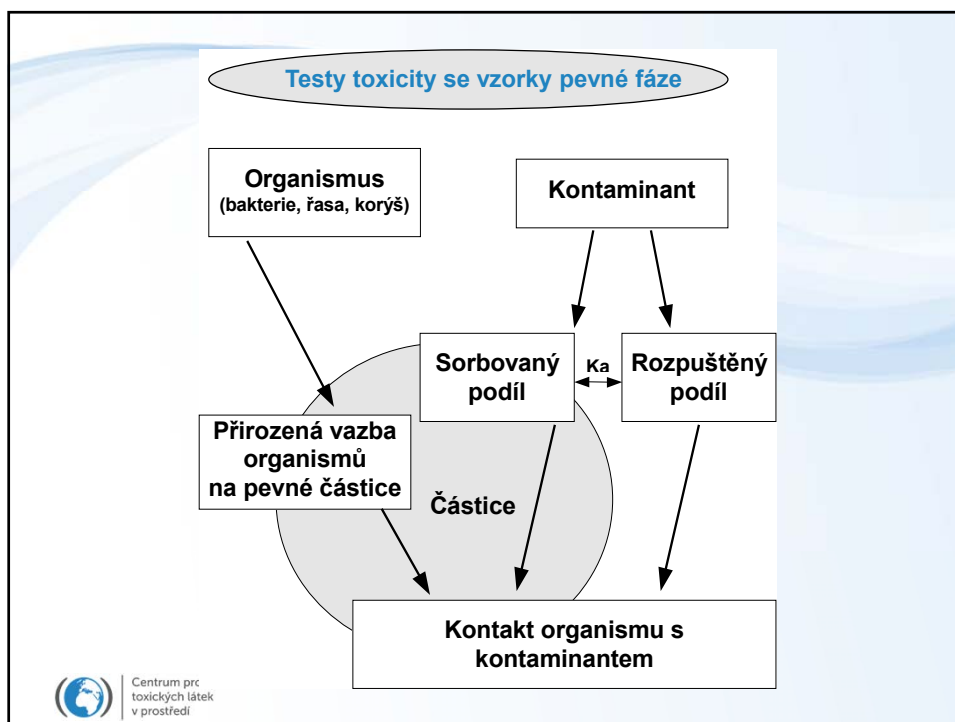
Count

Results in 30 Seconds!



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

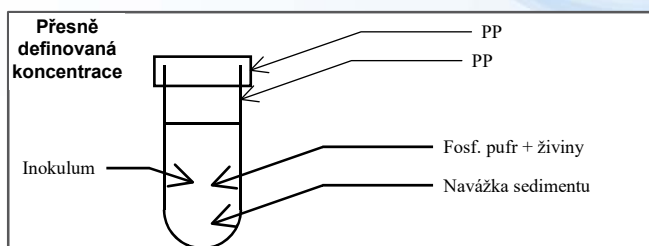




Dehydrogenázní aktivita

Expozice bakterie probíhá přímo ve vzorku pevného skupenství. Její metabolický stav je hodnocen pomocí měření aktivity dehydrogenáz. Suspenze buněk *B. cerea* spektrofotometricky ověřené koncentrace je přidána do suspenze vody a pevného vzorku.

Po inkubaci (2h, 70 rpm, 25° C) je do suspenze přidán resazurin (oxido-redukční barvivo indikující aktivitu bakteriální dehydrogenázy) ve fosforečnanovém pufru. Po 15 min. je směs zcentrifugována a reakce přerušena filtrací supernatantu přes membránový filtr (velikost pórů 0,2 mm). Zredukovaný resazurin mění barvu, je tudíž možné míru jeho přeměny spektrofotometricky kvantifikovat.

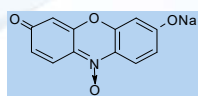


inkubace (2h, 70 rpm, 25 °C)
+ resazurin



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

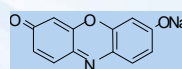
Dehydrogenázní aktivita



Resazurin

$\lambda_{\text{max}} = 601,2\text{nm}$

modrofialová
barva



Resorufin

$\lambda_{\text{max}} = 571,4\text{nm}$

růžová barva



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Test na aktivitu dehydrogenáz

Test na aktivitu dehydrogenáz	
Organismus	<i>Bacillus cereus</i> , G+, (CCM 2010).
Princip	Jedná se o test, ve kterém je aplikována sbírková kultura bakterie <i>Bacillus cereus</i> přímo do vzorku pevného skupenství a její poškození se sleduje pomocí spektrofotometrického měření změn v množství specifického substrátu resazurinu (601nm), jehož redukce je úměrná změnám v aktivitě dehydrogenáz sledované buněk. Alternativou odečtu výsledků je spektrofotometrická detekce vznikajícího resorufinu (571nm). (Rönnpapel et al. 1995).
Reakční směs (V)	6 ml.
Předkultivace	18 hodin při kontinuálním třepání (220 rpm) při teplotě 21 °C, (OD ₆₀₁ =0,4).
Trvání testu	4 hodiny.
Teplota	21 °C.
Třepání	Kontinuální třepání 70 rpm.
Aseptická práce	Pouze při práci se zásobní kulturou.
Výhody	Bezextrakční test matrice pevného skupenství. Tato metoda testuje účinky i těch kontaminantů, které jsou vázané na povrch pevných částecek půd a sedimentů. Výhodou je jeho metodická „benevolentnost“ k přítomnosti kyslíku a dobrá rozpustnost resorufinu ve vodě a tím jeho jednoduchá extrahovatelnost.



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Toxi - Chromotest™

Toxi-Chromotest, Toxi-ChromoPad	
Organismus	<i>Escherichia coli</i> , gramnegativní (G-), K12 OR85.
Princip	Princip obou testů je založen na schopnosti toxikantů inhibovat <i>de novo</i> syntézu β-galaktosidázy v kmeni <i>Escherichia coli</i> , mutantu citlivému především k pesticidům, mykotoxinům a těžkým kovům (Kilroy et Gray 1995). Toxi-Chromotest je mikrodestičkový test, který slouží k testování kapalných vzorků a roztoků chemických látek. Při ToxiChromoPad variantě test probíhá ve zkumavkách. Vzorky se pak aplikují na filtrační papíry se substrátovou impregnací (test pro sedimenty, půdy). Lyofilizované bakterie jsou oživeny směsí živného média a specifického induktoru pro fenotypovou produkci enzymu. Jsou následně smíchány s testovaným vzorkem, který může inhibovat obnovovací proces a syntézu β-galaktosidázy. Směs je u Toxi-Chromotestu nanášena do serologických destiček a množství enzymu je stanoveno semikvantitativně kolorimetrickou reakcí nebo může být kvantifikováno na čtecím zařízení pro destičky (Reinhartz et al. 1987). V případě ToxiChromoPadu jsou výsledky hodnoceny jen srovnáním vytvořené kontrolní barvy na filtračním papíře s variantou vzorku (EBPI, 1995), (Kwan 1993, Kwan 1995, Rao et al., 1991).
Citlivost	Kwan et Dutka 1990 srovnávali tyto testy s Microtox® testem. Především u vzorků sedimentů jsou tyto testy méně citlivé, než Microtox. Naopak u mykotoxinů a pesticidů byl ToxiChromotest citlivější (Kilroy et Gray 1995).
Reakční směs (V)	U Toxi-ChromoPadu je reakční směs 500 μl, u klasické mikrodestičkové verze Toxi-chromotestu 250 μl.
Předkultivace	Dostatečná doba resuscitace 10 minut.
Aseptická práce	Aseptická práce je nutná při jakékoliv manipulaci se zásobní kulturou.
Trvání testu	2 hodiny.
Teplota	37 °C

Toxi - Chromotest™

Recovery Medium and Sample Material

```

graph TD
    A[Stressed Bacterial Cell] --> B[Recovery Medium and Sample Material]
    B --> C{if material is non-toxic:  
bacteria recover and grow}
    B --> D{if material is toxic:  
bacteria do not recover}
    C --> E[synthesis of beta-galactosidase]
    D --> F[no synthesis of beta-galactosidase]
    E --> G[chromogenic substrate added]
    F --> G
    G --> H[colour development]
    G --> I[no colour development]
  
```

-The activity of the induced (by cocktail containing a specific inducer of β -galactosidase) enzyme is detected by the hydrolysis of a chromogenic substrate

-It is sensitive to a wide spectrum of toxic substances such as heavy metals, and organic and inorganic pollutants, and may be used to detect the presence of toxicants in water and soil/sediment extracts

- If the sample is not toxic, a distinctive blue (or yellow) colour quickly develops

Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Toxi - Chromotest™

Přehled v praxi nejčastěji používaných substrátů pro stanovení beta-galaktosidázy:

- ONPG BEZBARVÁ - ŽLUTÁ
- CPRG NAŽLOUTLÁ - ČERVENÁ
Chlorophenol red-beta-D-galacto- pyranoside,
monosodium salt
- X-GAL ŽLUTÁ - MODRÁ
-5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-
galactopyranoside, crystals

Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Toxichromo-Pad®

Ukázka KITu na stanovení toxicity v pevné matici



Toxichromo-test®

Ukázka KITu na stanovení toxicity v kapalně matici





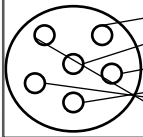
<http://www.ebpi.ca/>



Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí

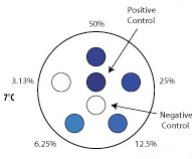
Toxi - ChromoPad™


Toxi - ChromoPad




0,5g of samples

- 3,13 % Control
- 6,25 %
- 12,5 %
- 25 %
- 50 %



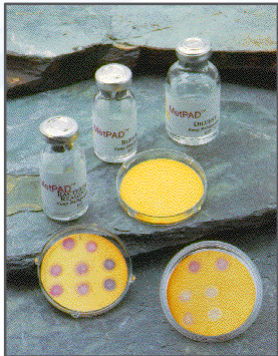




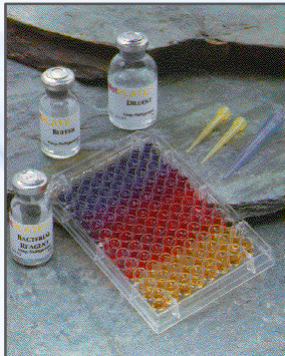
Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí

MetPad, MetPlate, FluoroMetPlate, MetSoil

MetPad




MetPlate



Enzymová inhibice syntézy B-galaktosidázy

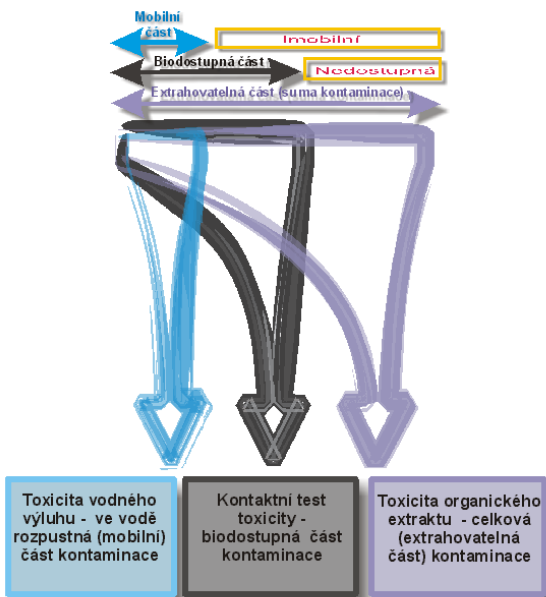
35°C, 90 min., rehydratace lyofilizované kultury


- Kultura s vysokou citlivostí na těžké kovy
- test provádět vždy v kombinaci s jiným testem,
- FluoroMetPlate - fluorogenní substrát

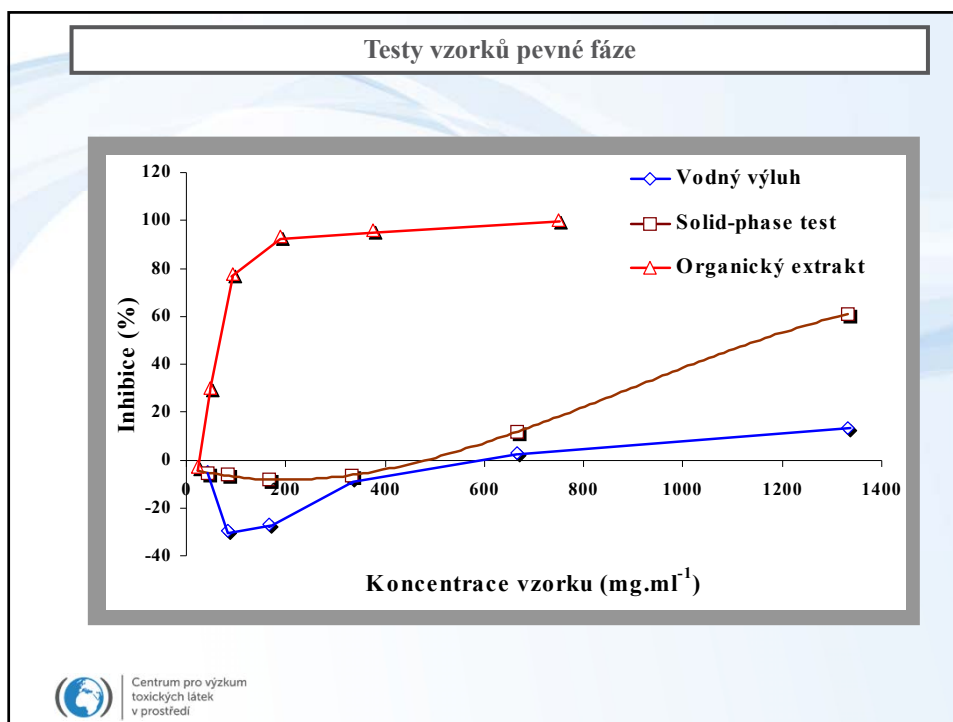

 Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Testy vzorků pevné fáze

TREND:




 Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí



Hodnocení bakteriálních testů

<u>Výhody</u>	<u>Nevýhody</u>
nízká finanční a časová náročnost	jednobuněčný organismus
vysoká citlivost	testování extraktů
uchovávání a příprava testovacích organismů	vliv zákalu vzorků
miniaturizované provedení	pouze akutní účinky
instrumentální metody	laboratorní podmínky
	omezená extrapolace výsledků

Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí

Trendy ve vývoji bakteriálních testů

standardizace metod
miniaturizace provedení
moderní instrumentální analytické metody
SPT testy (testování účinků biodostupné frakce)
KOMBINOVANÉ



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

MARA

MARA (Microbial Assay for Risk Assessment)

The MARA product is a multi-species toxicity test based on an array of 11 micro-organisms that

- is simple to use
- provides a 'battery of tests' within a test
- produces data for 11 test results
- can be used to produce toxic fingerprints of chemicals or environmental samples
- requires small sample volumes



MARA

The MARA test includes genetically diverse organisms from the following groups:

Prokaryotes

- Gram +ve
- Gram -ve

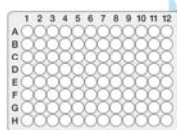
Eukaryote

- yeast



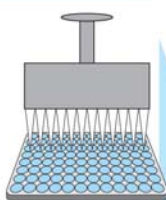
TEST TOXICITY: experimentální design

Assay Procedure



Preparation

Lyophilised Organisms
Reconstitution
30°C
4h

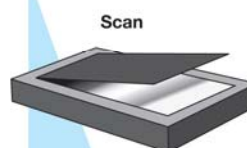


Assay

Substrate
Medium + Dye
Sample
Dilution series
Inoculation

Incubation

30°C
18h



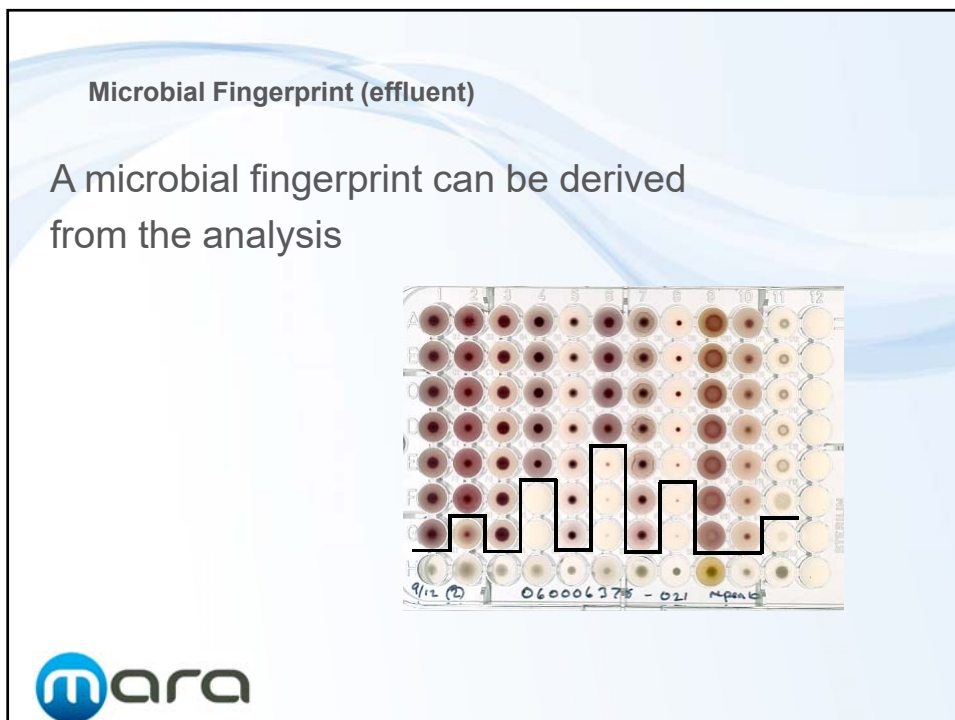
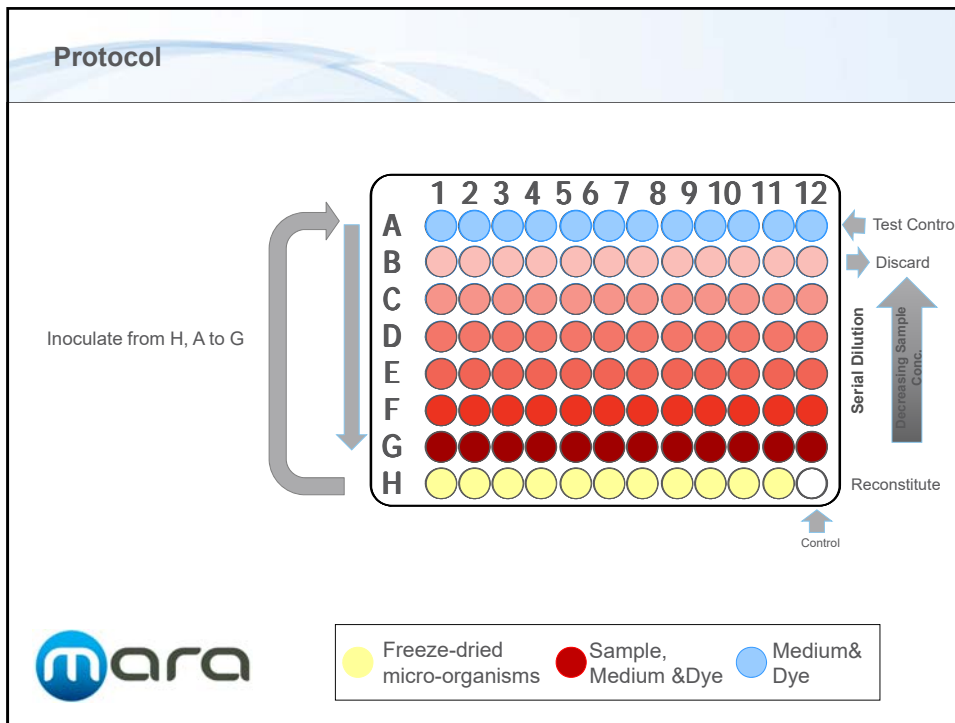
Scan

Data Analysis

Dedicated Software

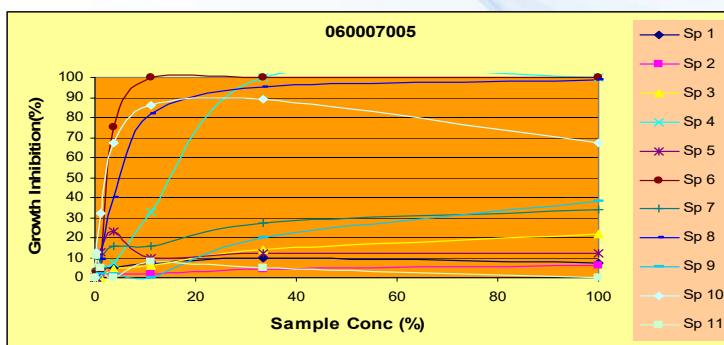


Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí



Species Response

When the data generated by the software is plotted, each of the species shows a different response to the toxicant.



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Mara Starter Pack



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí


Zařazení do baterie testů

**Dle cíle hodnocení
a dle typu vzorku**

**Aspekt trofické úrovně
testovaného organismu**


Minimální výběr:

- bakterie
- řasy
- bezobratlí


 Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

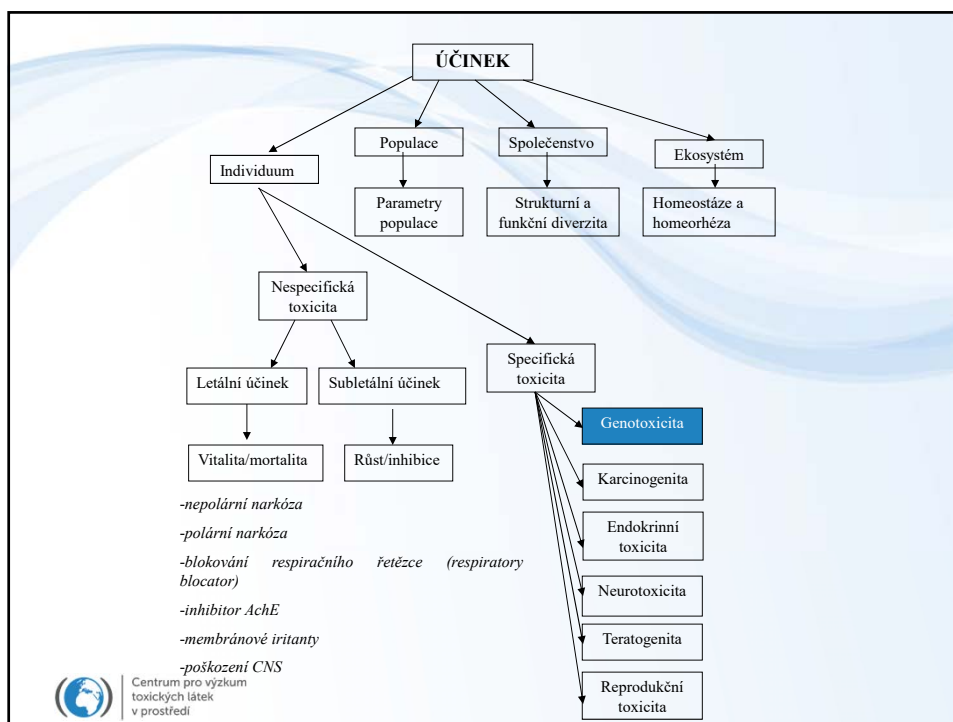
Testy genotoxicity

GENOTOXICITA



- toxická pro genom buněk
- **genotoxické faktory jsou schopny interagovat s DNA za vzniku reverzibilních i ireverzibilních změn**
- **poškození genomu může následně vést k mutagenézi, karcinogenezi, indukci fágů, buněčné smrti, chromozomálním aberacím a dalším neméně závažným důsledkům**

 Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí



MUTACE

- za mutaci je považována jakákoliv změna v genetické informaci buněk, která není výsledkem rekombinace či segregace při dělení buněk, a je přenášena do dalších generací buněk či jedinců.
- proces vzniku mutací je označován jako mutageneze.

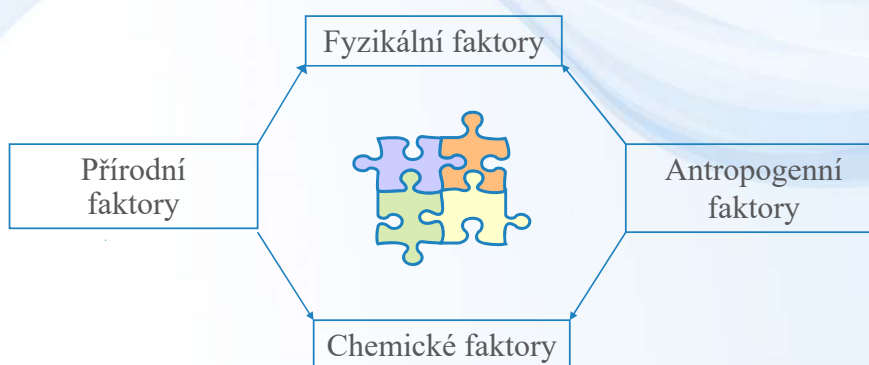
MUTAGENEZE

- několikafázový proces.
- genotoxická látka s mutagenními účinky po vstupu do organismu a na základě své toxikokinetiky proniká v původní či změněné podobě do buňky (fáze 1).
- následně dochází k interakci s DNA v genomu, jejichž podstatou je kovalentní vazba na molekulu DNA, interkalace mezi řetězce dvojšroubovice, interakce s mitotickými strukturami (fáze 2).
- mutace, tedy změna v genotypu, která není letální, může v určitém časovém horizontu vést k transkripci a realizaci změněné informace, která se následně promítá v podobě mutantního fenotypu (fáze 3).
- procesu mutagenese nemusí být dokončen v případě, že daný genotoxický zásah je pro danou buňku letální či mutace byla včas opravena.



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

GENOTOXICKÉ FAKTORY



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

AKTIVACE PROGENOTOXINŮ I.

přímé mutageny – skupina látek, jež vykazuje své genotoxické účinky ve stávajícím stavu díky přítomnosti silně elektrofilní skupiny.

nepřímé mutageny – látky, jež za normálních podmínek nevykazují genotoxické účinky, ale v případě enzymatické přeměny získávají vhodnou molekulární strukturu, která umožňuje účinnou interakci s DNA.

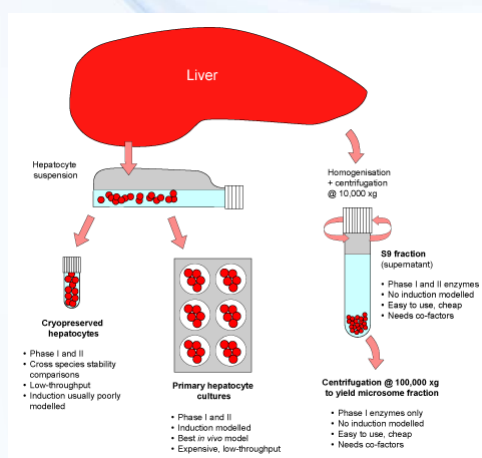


Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

AKTIVACE PROGENOTOXINŮ

Nejčastěji využívaným provedením metabolické aktivace je příprava mikrosomální frakce (S9 frakce):


- jaterní mikrosomální frakce z potkanů či myší
- mikrosomální frakce z plic, ledvin či mozku potkanů a myší
- jaterní mikrosomální frakce lidských jater
- jaterní mikrosomální frakce z ryb
- rostlinná mikrosomální frakce



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

PŘEHLED NEJPOUŽÍVANĚJŠÍCH TESTŮ GENOTOXICITY A MUTAGENITY


VYHODNOCOVÁNÍ, INTERPRETACE A EXTRAPOLACE VÝSLEDKŮ TESTŮ



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

DETEKČNÍ SYSTÉMY GENOTOXICKÝCH ÚČINKŮ

- Jednoduchost
- Rychlost




Živočichové

Houby


**Detekční
systémy**

Bakterie

Rostliny



- Interpretace
- Extrapolace



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

PRINCIP BAKTERIÁLNÍCH TESTŮ GENOTOXICITY

Tři principiálně odlišné modely pro detekci genotoxických faktorů:

➤ **model 1: DNA léze vede ke změně smyslu informace**

V důsledku indukce reverzní mutace dochází k obnovení určité vlastnosti buněk testovacího kmene, která je následně sledována.

➤ **model 2: DNA léze indukuje SOS odpověď zahrnující SOS mutagenézi**

V důsledku indukce poškození DNA je spuštěn systém SOS odpovědi, která je determinována skupinou SOS genů, jejichž aktivace je následně sledována na základě přepisu vhodného spřaženého reportérového genu (specifický fúzní gen *SOS gen::reportérový gen*).

➤ **model 3: DNA léze vede ke smrti buňky**

Důsledkem poškození DNA u kmenů buněk, které nejsou schopné opravovat vzniklá poškození, je buněčná smrt.

PŘEHLED BAKTERIÁLNÍCH TESTŮ GENOTOXICITY

- **model 1:**
- Amesův test – vznik histidin-prototrofních CFU (Ames et al., 1975)
 - Ara-test – vznik L-arabinóza-rezistentních CFU (Englesberg et al., 1962)
 - Ampicilínový test – vznik ampicilín-rezistentních CFU (Lee et al., 1994)
 - Reverzní test na *E. coli* – vznik tryptofan-rezistentních CFU (Bridges, 1972)
 - Mutatox – obnovení bioluminiscence buněk (Johnson, 1992)
 - GFP test – obnovená schopnost produkce GFP (Cariello et al., 1998)
- **model 2:**
- SOS chromotest – indukce přepisu *sulA::lac-Z* (Quillardet et al., 1982)
 - UmuC test – indukce přepise *umuC::lac-Z* (Oda et al., 1985)
 - SulA test – indukce přepisu *sulA::lac-Z* (El Mzibri, 1996)
 - RecA test – indukce přepisu *recA::luxCDABE* (Min et al., 1999)
 - Vitotox – indukce přepisu *recN::luxCDABE* (Van der Lelie et al., 1997)
 - Lux-fluoro test – indukce přepisu *recA::luxCDABE* (Baumstark-Khan et al., 2001)
- **model 3:**
- Reparační test – pokles počtu CFU v důsledku poškození DNA (Green, 1977)



AMESŮV TEST I.

Specifikace

- jednoduchý screeningový nástroj, který je nejčastěji používán a jako jediný všeobecně doporučován národními normami

Princip

- test je založen na indukci reverzních mutací v histidinovém lokusu v buňkách geneticky modifikovaného kmene *Salmonella typhimurium*
- reverzní mutace je spojena s přeměnou histidin-auxotrofních buněk (His⁻) na histidin-prototrofní (His⁺)
- histidin-prototrofní buňky jsou následně schopné růst v médiu bez přítomnosti aminokyseliny histidinu
- obnova růstu a metabolické aktivity je signálem genotoxických účinků testovaného vzorku

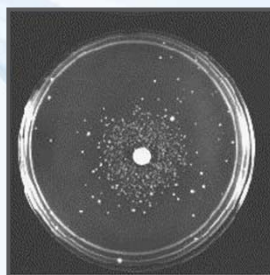


Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

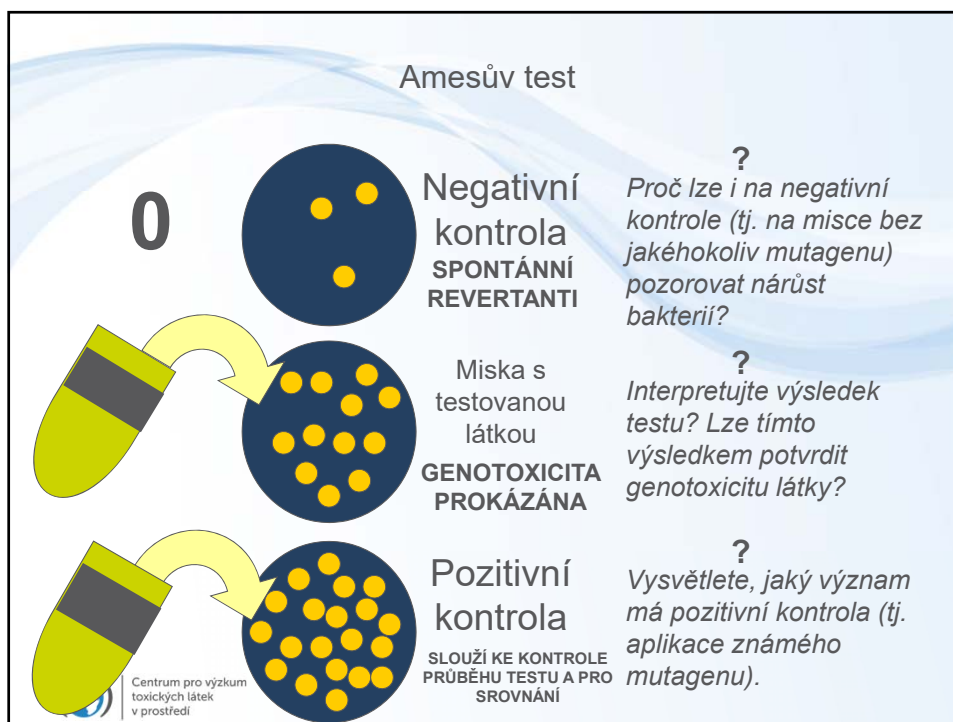
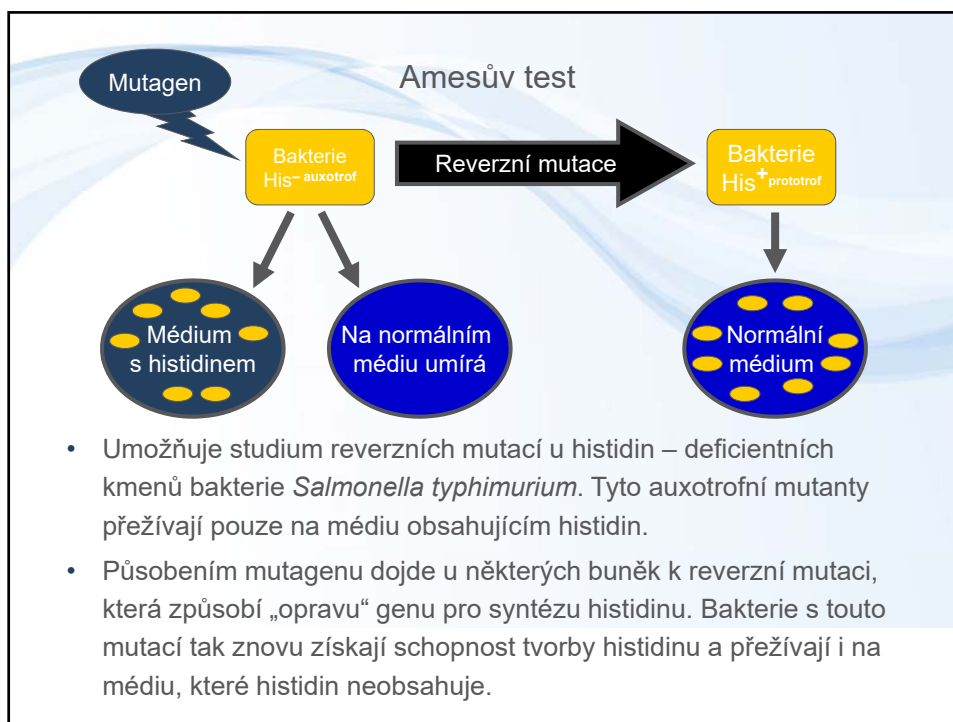
Amesův test



Bruce Ames (nar. 1928)



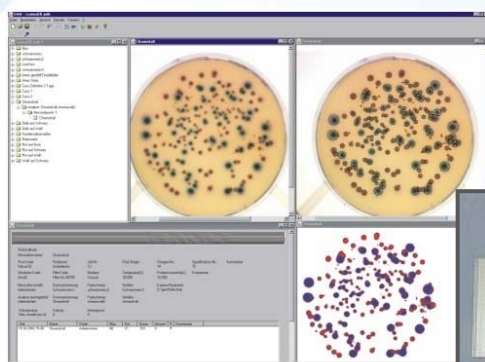
Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí



Výsledek Amesova testu



Amesův test – automatické odečtení výsledků



AMESŮV TEST

Flukтуаční verze Amesova testu – Mutachromoplate™ (EPBI)

Vyhodnocení: počet pozitivních jamek (žluté) X negativní kontrola.

(statistické vyhodnocení – Poissonova distribuce).

Případně počítáme mutagenní aktivitu (M.A.).



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

MUTATOX I.

Specifikace

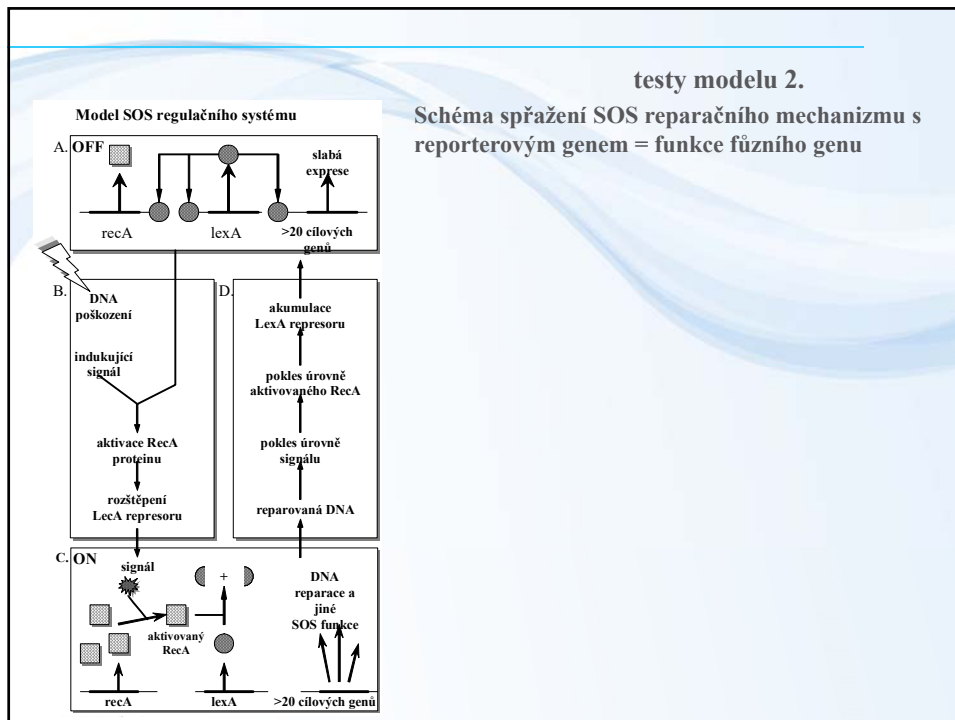
- krátkodobý, velmi citlivý screeningový test založený opět na indukce reverzních mutací (model 1.)

Princip

- test je opět založen na indukci reverzních mutací v důsledku iniciace substitucí, translokace, inhibice syntézy DNA nebo tvorby DNA aduktů genotoxickými látkami v luxCDABE operonu geneticky modifikované bakterie (*Photobacterium phosphoreum*) *Vibrio fischeri* M 169, která není schopná luminovat (dark cells)
- test probíhá v tekutém médiu !! v kyvetách, či mikrodestičkách
- v důsledku reverzní mutace je obnovena schopnost luminiscence buněk a na základě její kvantifikace je odhadován genotoxický potenciál testovaného vzorku



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí



SOS CHROMOTEST I.

sulA::lac-Z

Specifikace

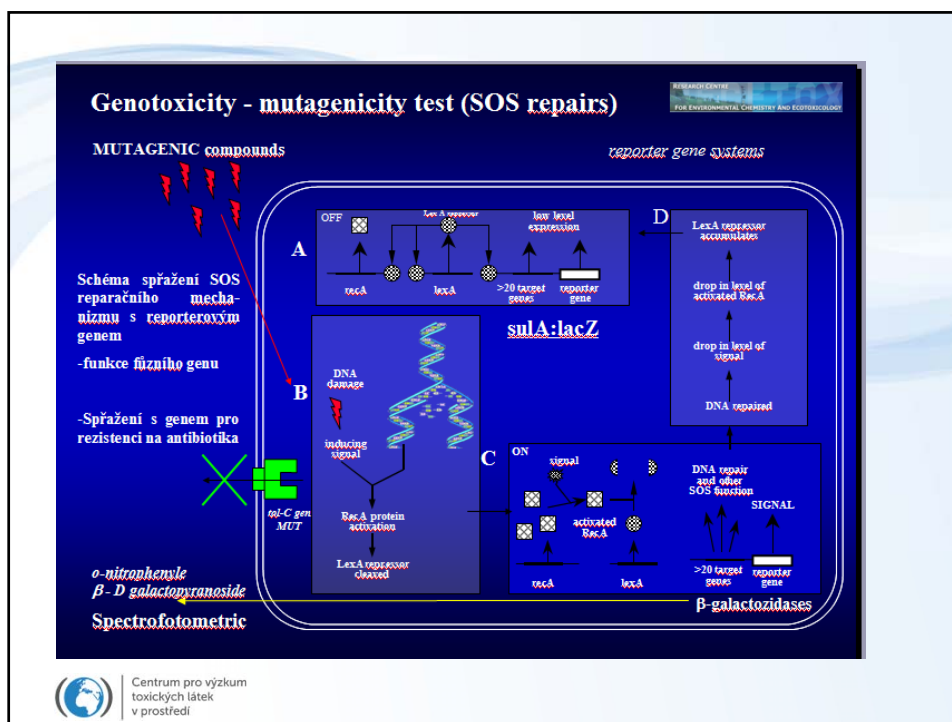
- jednoduchý, rychlý, screeningový nástroj s miniaturizovaným provedením založený na stejném principu jako umuC test

Princip

- podstatou SOS chromotestu je indukce SOS odpovědi v důsledku poškození DNA genotoxickou látkou
- ze skupiny SOS genů (din genů) je využíváno propojení sulA genu s reportérovým lac-Z genem
- cílenou genovou manipulací byl do kmene Escherichia coli PQ 37 vložen specifický fúzní gen sulA::lac-Z
- jako kontrola toxicity vzorku je kontinuálně bakterií syntetizována alkalická fosfatáza, jejíž pokles aktivity signalizuje inhibici buněk



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí



UMUC TEST I.

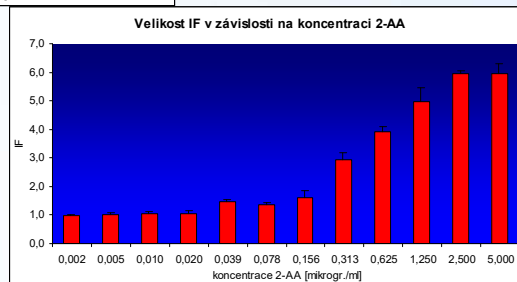
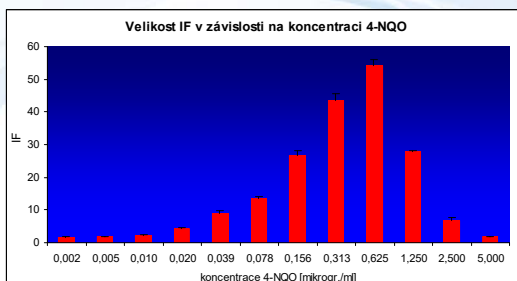
Specifikace

- Jednoduchý, rychlý, screeningový nástroj s miniaturizovaným provedením a širokou specifitou k různým skupinám genotoxických faktorů, který je založený na indukci SOS odpovědi (model 2)

Princip

- podstatou umuC testu je indukce SOS odpovědi v důsledku poškození DNA genotoxickou látkou
- ve skupině SOS genů (din genů) jsou obsaženy i **geny *umuC*** a *umuD*, jejichž přepis je zahrnut v komplexním procesu SOS odpovědi
- cílenou genovou manipulací byl do kmene *Salmonella typhimurium* TA 1535 **vložen plazmid pSK1002 nesoucí specifický fúzní gen *umuC::lac-Z***

UMUC TEST X.



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

VITOTOX I.

Specifikace

- Jednoduchý, rychlý, screeningový nástroj s miniaturizovaným provedením založený na stejném principu jako umuC test

Princip

- podstatou Vitotoxu je opět indukce SOS odpovědi v důsledku poškození genomu testovacího kmene *Salmonella typhimurium*
- tentokrát je využíván geneticky manipulovaný kmen *Salmonella typhimurium*, jež obsahuje lux operon luxCDABE izolovaný z *Vibrio fischeri* jako reporterný gen (v rámci fúzního genu *recN:luxCDABE*)
- reporterný operon je uložen v plazmidu pMOL1067 nebo pMOL1068



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

recA TEST

Specifikace

- Jednoduchý, rychlý, screeningový nástroj s miniaturizovaným provedením založený na stejném principu jako umuC test

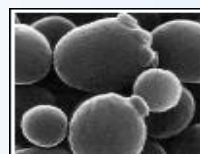
Princip

- podstatou RecA je opět indukce SOS odpovědi v důsledku poškození genomu testovacího kmene *Escherichia coli* **DPD2794**
- tentokrát je využíván geneticky manipulovaný kmen *Escherichia coli*, jež obsahuje fúzní gen **recA::luxCDABE**
- Fúzní gen je tvořen bezpromotorovým operonem *lux operon luxCDABE* izolovaným z *Vibrio fischeri*, který byl opatřen promotorem recA genu podléhajícímu regulaci ze strany *lexA* proteinu
- reportérový operon je uložen v plazmidu



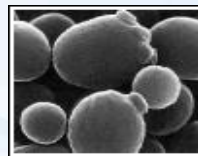
Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

TESTY GENOTOXICITY NA KVASINKÁCH



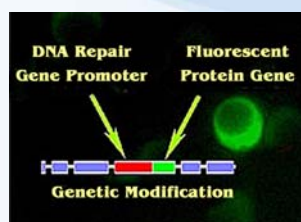
Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

➤ RAD54 - GFP



Geneticky modifikovaný kmen *Saccharomyces cerevisiae*

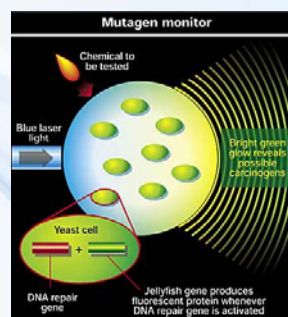
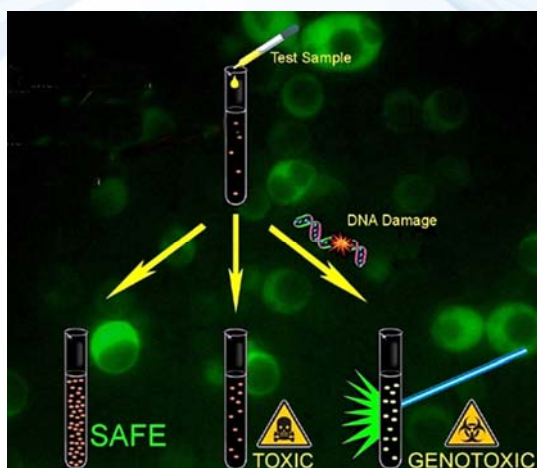
Kopie promotoru pro reparační gen umístěn před gen pro GFP protein vykazující fluorescenci



Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí

➤ RAD54 - GFP

Princip testu:

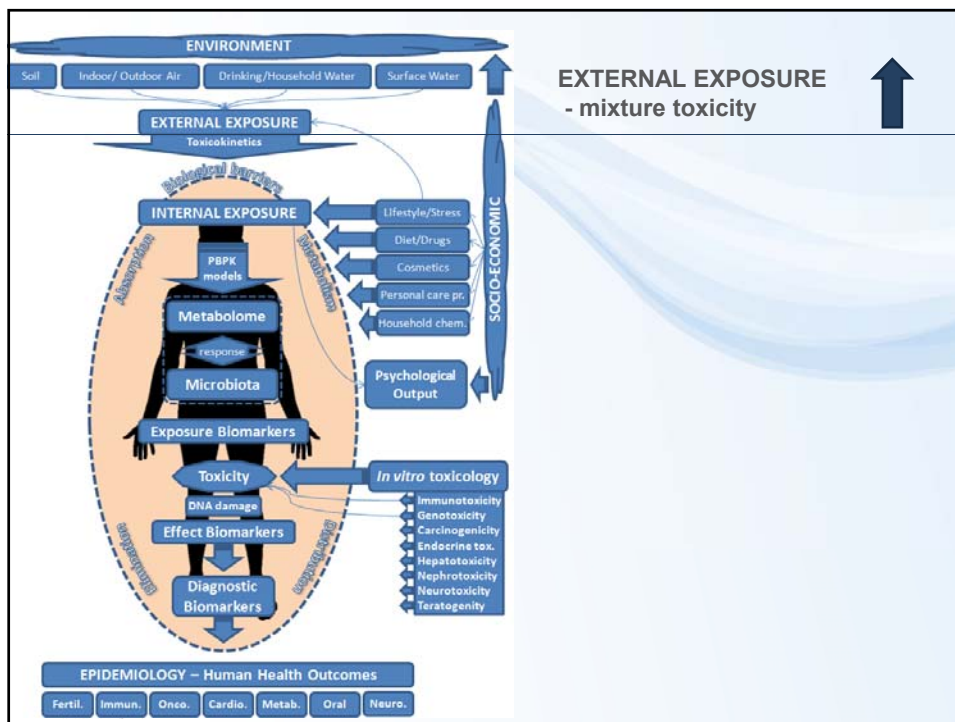
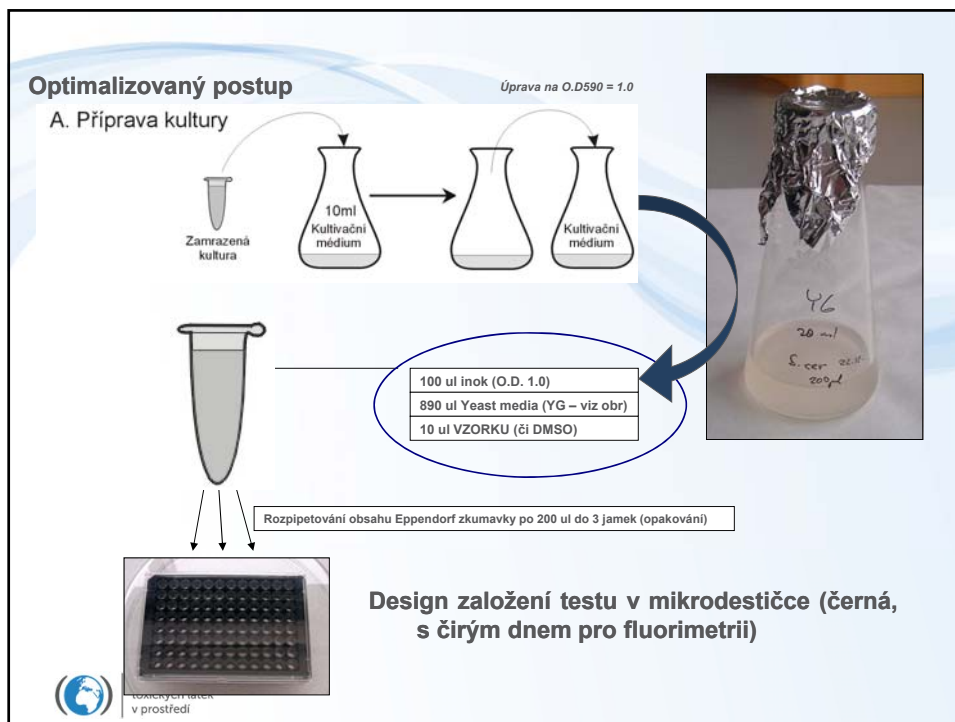


Po poškození DNA dojde ke spuštění reparačního procesu a tím i k produkci tohoto GFPproteinu, který je detekován měřením fluorescence

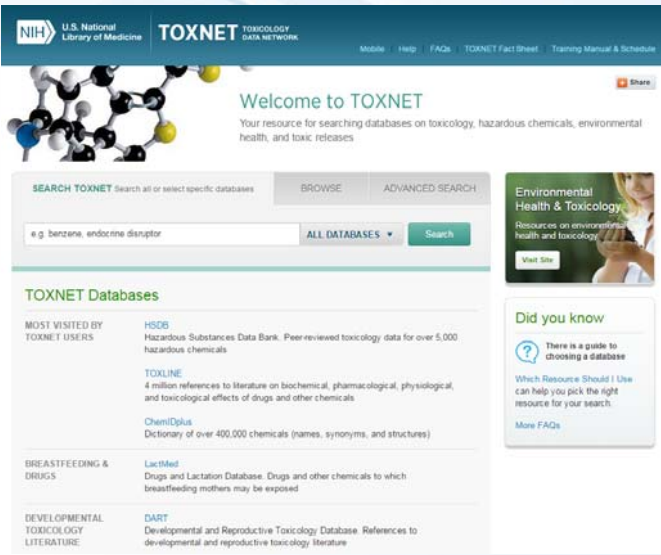
Paralelně sledování cytotoxicity měřením absorbance (A600)



Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí



TOXNET - database <http://toxnet.nlm.nih.gov/>



TOXNET Databases

MOST VISITED BY TOXNET USERS	HSDB Hazardous Substances Data Bank. Peer-reviewed toxicology data for over 5,000 hazardous chemicals.
	TOXLINE 4 million references to literature on biochemical, pharmacological, physiological, and toxicological effects of drugs and other chemicals.
	ChemIDplus Dictionary of over 400,000 chemicals (names, synonyms, and structures).
BREASTFEEDING & DRUGS	LactMed Drugs and Lactation Database. Drugs and other chemicals to which breastfeeding mothers may be exposed.
DEVELOPMENTAL TOXICOLOGY LITERATURE	DART Developmental and Reproductive Toxicology Database. References to developmental and reproductive toxicology literature.

<http://toxnet.nlm.nih.gov/newtoxnet/genetox.htm>

TOXNET – GENETOX database

Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí



*„Možná, že se vám pane doktore zdá, že tady nikdo není.
Ale já ji tuším, tu bestii bakteriální!“*

Kresba © Pavel Kantorek

Literatura:
<https://books.google.cz/books?id=9WUx4DZm1-c&pg=PR11&printcase=frontmatter>

VIZITKA:




doc. RNDr. Pavel Čupr, Ph.D.
cupr@recetox.muni.cz

Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí