


RECE TOX RESEARCH CENTRE FOR ENVIRONMENTAL CHEMISTRY AND ECOTOXICOLOGY

Genotoxicity test (SOS repairs)

Test genotoxicity	Princip
SOS-chromotest®	-je založen na sledování indukce SOS – odpovědi v důsledku poškození genetické informace – DNA genetiky modifikovaného kmene – transgenních buněk <i>Escherichia coli</i> .
	-Ze skupiny SOS genů (din genů) je využíváno spřázení regulace exprese SOS genu <i>suIA</i> s reportérovým <i>lac-Z</i> genem (zodpovědným za syntézu <i>β</i>-galaktosidázy , která umožňuje po přidavku specifického substrátu spektrofotometrickou detekci v médiu).
	PROKARYOTICKÝ MODEL - specifický fúzní gen <i>suIA::lac-Z</i>

Genotoxicity - mutagenicity test (SOS repairs)

MUTAGENIC compounds

reporter gene systems

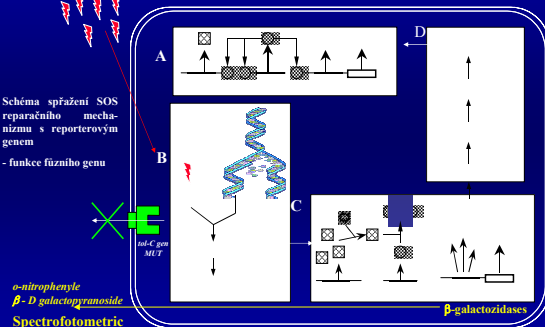


Schéma spřázení SOS reparačního mechanismu s reportérovým genem - funkce fúzního genu

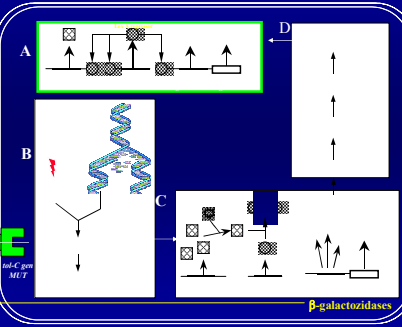
o-nitrophenyle β -D galactopyranoside Spectrofotometric

β -galaktosidáze

Genotoxicity - mutagenicity test (SOS repairs)

Protein LexA (repressor) je vázán ve specifických místech promotorové části SOS genu a tak blokuje celý SOS reparační systém.

lac-Z operon (syntéza *β*-galaktosidázy) má odstraněnou promotorovou část a podléhá tedy společné kontrole s vybraným SOS genem



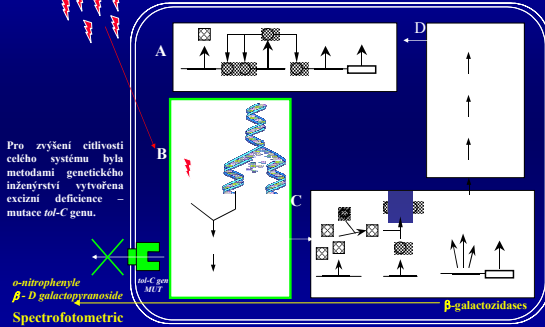
o-nitrophenyle β -D galactopyranoside Spectrofotometric

β -galaktosidáze

Genotoxicity - mutagenicity test (SOS repairs)

MUTAGENIC compounds

reporter gene systems



Pro zvýšení citlivosti celého systému byla metodami genetického inženýrství vytvořena existní deficeience – mutace *tol-C* genu.

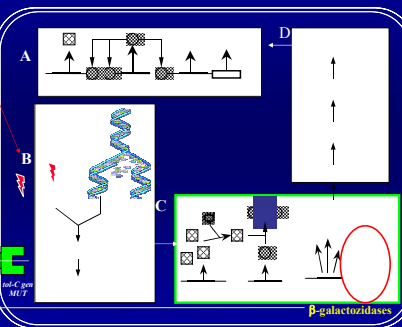
o-nitrophenyle β -D galactopyranoside Spectrofotometric

β -galaktosidáze

Genotoxicity - mutagenicity test (SOS repairs)

MUTAGENIC compounds

reporter gene systems



Poškození DNA = přepis *recA* genu, který umožňuje aktivaci specifického RecA proteinu, který štěpí repressor LexA a umožňuje přepis jednotlivých SOS genů a tedy spuštění celého SOS reparačního systému.

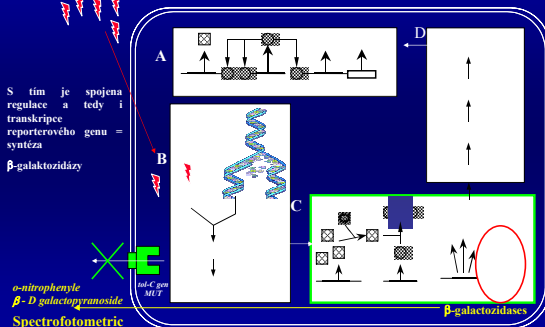
o-nitrophenyle β -D galactopyranoside Spectrofotometric

β -galaktosidáze

Genotoxicity - mutagenicity test (SOS repairs)

MUTAGENIC compounds

reporter gene systems



S tím je spojena regulace a tedy i transkripce reportérového genu = syntéza β -galaktosidázy

o-nitrophenyle β -D galactopyranoside Spectrofotometric

β -galaktosidáze

Genotoxicity - mutagenicity test (SOS repairs)

MUTAGENIC compounds reporter gene systems

aktivita je měřena spektrofotometricky na základě kvantitativní přeměny vhodně zvoleného chromogenního substrátu:

ONPG (colorless) + H₂O → Beta Galactose + ONP (yellow)

lac_z (beta-galactosidase)

RECE TOX RESEARCH CENTRE FOR ENVIRONMENTAL CHEMISTRY AND ECOTOXICOLOGY

Přehled v praxi nejčastěji používaných substrátů pro stanovení β -galaktozidázy:

- ONPG BEZBARVÁ \Rightarrow ŽLUTÁ
- CPRG NAŽLOUTLÁ \Rightarrow ČERVENÁ
- X-GAL ŽLUTÁ \Rightarrow MODRÁ

Chlorophenol red-beta-D-galactopyranoside, monosodium salt

-5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside, crystals

Klíčový represorový protein LexA:

RECE TOX RESEARCH CENTRE FOR ENVIRONMENTAL CHEMISTRY AND ECOTOXICOLOGY

Provedení testu

Příprava inokula

A.

- příprava standardního inokula (17 hodin při 37 °C)
- standardizace hustoty buněčné suspenze

RECE TOX RESEARCH CENTRE FOR ENVIRONMENTAL CHEMISTRY AND ECOTOXICOLOGY

Provedení testu

B.

Step 2: Aseptické podmínky

Step 1: 990 µl of phosphate buffer + LB medium 1:3, 990 µl of reaction medium

10 µl of sample in DMSO

10 µl of standard

1 2 3 4 5 6 7 8

Blank + PK + NK

po naředění inokula na vhodnou hustotu přidáváme kulturu do předem rozředěné řady vzorků - ředící řady,

stejným způsobem připravíme BL, NK (DMSO), PK (4-NQO - 4nitroquinoline-N-oxide, 2-AA)

RECE TOX RESEARCH CENTRE FOR ENVIRONMENTAL CHEMISTRY AND ECOTOXICOLOGY

Provedení testu

C.

2 microplates \leftarrow 100 µl of PNPP solution, 100 µl of ONPG solution

Sample 1, Sample 2, Sample 3

Blank + PK + NK

Incubation 2 hod

25 µl to each microplate in triplicate

Absorbance measurement at 420 nm after 45 min incubation



Provedení testu – CYTOTOXICITA

- vyloučení falešně negativní výsledky

jako kontrola toxicity vzorku je kontinuálně bakterií syntetizována **alkalická fosfatáza**, jejíž pokles aktivity signalizuje inhibici buněk.



Produkce klesá s inhibicí proteosyntézy

aktivitu alkalické fosfatázy měříme na základě přeměny PNPP

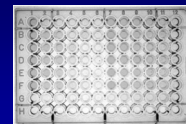
p-nitrofenylfosfát



Výhody

Výhodou tohoto testu je zejména jeho jednoduchost, nenáročnost na materiál a chemikálie, která je navíc umocněna mikrodestičkovým provedením testu

Spektrofotometrická stanovení provádíme pomocí mikrodestičkového readeru.



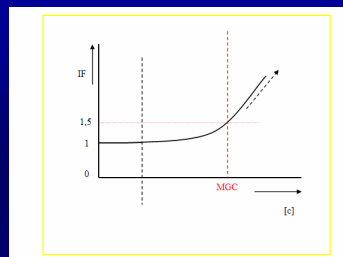
Vyhodnocení výsledků testu

$$AP_i = \frac{\Delta A_{420} (RB_i) - \Delta A_{420} (BL)}{\Delta A_{420} (NK) - \Delta A_{420} (BL)}$$

$$IF_i = \frac{1}{AP_i} \times \frac{\Delta A_{420} (RB_i) - \Delta A_{420} (BL)}{\Delta A_{420} (NK) - \Delta A_{420} (BL)}$$

Hodnocení

➤ vyhodnocení významnosti odpovědi: $IF \leq 1,5$



Vyhodnocení výsledků testu

- MGC - minimální genotoxická koncentrace
- RGTU - relativní genotoxická jednotka

$$RGTU = \frac{1}{MGC} \times 100$$