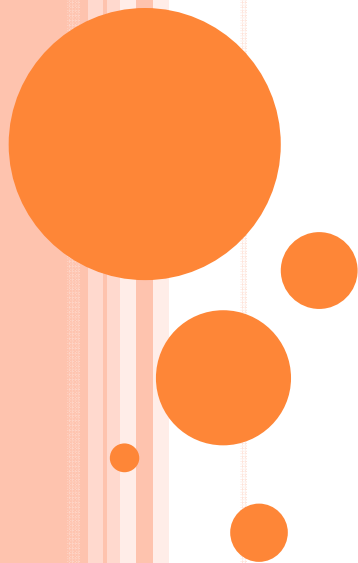


# **KVALITA VODY – STANOVENÍ GENOTOXICITY VODY A ODPADNÍCH VOD POMOCÍ UMUČ TESTU**



## UMUC TEST

- Jednoduchý screeningový nástroj s miniaturizovaným provedením a širokou specifitou k různým skupinám genotoxických faktorů
- Podstatou umuC testu je indukce SOS odpovědi v důsledku poškození DNA genotoxickou látkou
- Princip testu: testované organismy jsou exponovány testovanou látkou (vzorkem) s nebo bez metabolické aktivace
- Testovací organismus: *Salmonella typhimurium* TA1535/pSk1002



## *SALMONELLA TYPHIMURIUM* TA1535

- Používá se organismus nesoucí plazmid Sk1002 s umuC-lacZ genem a rezistentní vůči ampicilinu
- Bakterie je uchovávána v 150 µl media s 10% DMSO nebo 20% glycerolu
- Teplota -80°C
- 2 ml ampule



## REAGENTS

- Roztoky musí být připraveny sterilně, za použití sterilní, deionizované vody
- 1 mol/l HCl, 1 mol/l NaOH,  $C_2H_6SO_4$
- TGA medium (pH  $7,0 \pm 0,2$ , uchováváno při  $-20^\circ C$ ), 10x koncentrované TGA medium
- B-pufr, fosfátový pufr, S9 mix, ONPG, stop reagent (roztok  $Na_2CO_3$  ve vodě)



## PŘÍPRAVA VZORKU

- Test by se měl provádět bezprostředně po odběru, pokud ne, měly by být vzorky uchovávány při 4°C
- Vzorky by měly být analyzovány v tomto případě 48 hodin po odběru



## PŘÍPRAVA KULTURY

- Ampulka se zásobní kulturou se nechá roztát a 1 ml se přidá do 20 ml TGA media, centrifuguje se
- Odlije se supernatant a resuspenduje se v 1 ml čerstvého media
- Nechá se inkubovat přes noc při 37°C, 12 h
- Změří se optická densita  $A_{600}$  (použití TGA media jako blank) a bakterie se naředí na potřebnou hustotu



# SCHÉMA PIPETOVÁNÍ

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1 1:1,5	S1 1:1,5	S1 1:1,5	S1 1:3	S1 1:3	S1 1:3	S1 1:6	S1 1:6	S1 1:6	S1 1:12	S1 1:12	S1 1:12
B	S2 1:1,5	S2 1:1,5	S2 1:1,5	S2 1:3	S2 1:3	S2 1:3	S2 1:6	S2 1:6	S2 1:6	S2 1:12	S2 1:12	S2 1:12
C	S3 1:1,5	S3 1:1,5	S3 1:1,5	S3 1:3	S3 1:3	S3 1:3	S3 1:6	S3 1:6	S3 1:6	S3 1:12	S3 1:12	S3 1:12
D	S4 1:1,5	S4 1:1,5	S4 1:1,5	S4 1:3	S4 1:3	S4 1:3	S4 1:6	S4 1:6	S4 1:6	S4 1:12	S4 1:12	S4 1:12
E	S5 1:1,5	S5 1:1,5	S5 1:1,5	S5 1:3	S5 1:3	S5 1:3	S5 1:6	S5 1:6	S5 1:6	S5 1:12	S5 1:12	S5 1:12
F	S6 1:1,5	S6 1:1,5	S6 1:1,5	S6 1:3	S6 1:3	S6 1:3	S6 1:6	S6 1:6	S6 1:6	S6 1:12	S6 1:12	S6 1:12
G	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
H	PC	PC	PC	SC	SC	SC	BL	BL	BL	BL	BL	BL

- S1, S2, S3, S4, S5, S6 ...vzorky o různém ředění
- NC ...negativní kontrola
- PC ...pozitivní kontrola
- SC ...kontrola použitého rozpouštědla
- BL ...blank



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1 1:1,5	S1 1:1,5	S1 1:1,5	S1 1:3	S1 1:3	S1 1:3	S1 1:6	S1 1:6	S1 1:6	S1 1:12	S1 1:12	S1 1:12
B	S2 1:1,5	S2 1:1,5	S2 1:1,5	S2 1:3	S2 1:3	S2 1:3	S2 1:6	S2 1:6	S2 1:6	S2 1:12	S2 1:12	S2 1:12
C	S3 1:1,5	S3 1:1,5	S3 1:1,5	S3 1:3	S3 1:3	S3 1:3	S3 1:6	S3 1:6	S3 1:6	S3 1:12	S3 1:12	S3 1:12
D	S4 1:1,5	S4 1:1,5	S4 1:1,5	S4 1:3	S4 1:3	S4 1:3	S4 1:6	S4 1:6	S4 1:6	S4 1:12	S4 1:12	S4 1:12
E	S5 1:1,5	S5 1:1,5	S5 1:1,5	S5 1:3	S5 1:3	S5 1:3	S5 1:6	S5 1:6	S5 1:6	S5 1:12	S5 1:12	S5 1:12
F	S6 1:1,5	S6 1:1,5	S6 1:1,5	S6 1:3	S6 1:3	S6 1:3	S6 1:6	S6 1:6	S6 1:6	S6 1:12	S6 1:12	S6 1:12
G	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
H	PC	PC	PC	SC	SC	SC	BL	BL	BL	BL	BL	BL

- 120 µl destilované vody všude kromě A-F (1-3) a H (1-6)
- 360 µl vzorku do prvních tří jamek (poté se rozředí do ostatních jamek)
- 153 µl vody do PC a SC (H1 až H6)
- 27 µl 30% DMSO ve vodě do SC (H4-H6)
- 27 µl 4-NQO (4-Nitroquinoline N-oxide) (finální koncentrace 50 ng/ml) do PC (H1-H3)
- 20 µl 10x zahuštěného TGA media do všech jamek
- 70 µl inokula do všech jamek kromě BL
- 70 µl TGA media do BL





- Přidá se 30  $\mu\text{l}$  ONPG a nechá se inkubovat 30 min za stálého míchání, při 28°C
- 120  $\mu\text{l}$  stop reagentu
- Měří se absorbance v každé jamce při 420 nm



# VÝPOČTY MĚŘENÍ

- G...růstový faktor:

$$G = (A_{600,T} - A_{600,B}) / (A_{600,N} - A_{600,B})$$

$A_{600,T}$  absorbance vzorku

$A_{600,N}$  absorbance NK

$A_{600,B}$  absorbance BL

- Aktivita  $\beta$ -galaktosidázy:

$$U_T = (A_{420,T} - A_{420,B}) / (A_{600,N} - A_{600,B})$$

- Indukční poměr:

$$I_R = 1/G \times (A_{420,T} - A_{420,B}) / (A_{420,N} - A_{420,B})$$



## VALIDACE

- Test je validní, pokud PK dosáhne indukčního poměru ( $I_R$ ) minimálně 2
- Minimální nárůst NK je  $G = 1$  až 12
- Výsledky nemohou být hodnoceny, pokud  $G < 0,5$
- Voda je genotoxická, pokud je indukční poměr vyšší než 1,5

