

Ames Test

Reversion von Mutationen durch UV-Licht und mutagene Substanzen

1) Einleitung

Mutationen sind vererbare Veränderungen der genetischen Information. Normalerweise treten Mutationen recht selten auf, die spontane Mutationsrate beträgt einen Nukleotidaustausch pro Zellgeneration auf 10^9 - 10^{10} Nukleotidpaare. Mutagene sind Stoffe oder Strahlungen, die die Mutationsrate erhöhen. Da Kanzerogenese immer auf Mutationen zurückgeht und Mutationen in der Keimbahn auch schwere Erbkrankheiten verursachen können, ist es wichtig, neu synthetisierte Substanzen schnell auf ihre Mutagenität testen zu können, was z.B. mit dem Ames Test möglich ist.

2) Material

- Bakterien (Übernachkulturen): Salmonella typhimurum, Stämme: LT2 (=Wildtyp) und TA 98 (Mutanten mit Leserastermutation „hisG46“ und ohne UvrB-Exzisionsreparatursystem)
- UV-Stratalinker
- Minimalmedium-2% Glukose-Platten (MM-Platten)
- MM-Flüssigmedium
- Weichagar mit Minimalmedium mit sehr wenig, praktisch ohne Histidin (→ MM-A)
- Weichagar mit Minimalmedium mit Histidin (→ MM-B)
- Weichagar-Auftragsröhrchen
- Reagenzglasständer, Schüttelheizblock, Wasserbad, Vortex
- Pipetten, Pipettierhilfen
- Benzo(a)pyren (0,5mg/ml Dimethylsulfoxid DMSO) als Mutagen
- Phosphatpuffer pH 7,4
- Rattenleber-Homogenisat (S9)

3) Methode

Versuch 1:

Nach dem Beschriften der noch leeren Platten und Weichagarröhrchen nach dem vorgegebenen Plan (Skript S.28) werden die Röhrchen mit je 3ml des entsprechenden Agar (MM-A bzw. MM-B) befüllt und im Wasserbad flüssig gehalten. Anschließendes Herstellen einer 10^6 -Verdünnungsreihe beider Bakterienstämme (allerdings nicht wie im Skript (S.29) 3-mal 0,1ml + 9,9ml, sonder je 50 μ l + 4,95ml).

Nach dem Plan (Skript, S. 28) werden je 100 μ l der entsprechenden Bakterien in die entsprechenden Weichagarröhrchen gegeben, sogleich gevortex und schnell mit der Weichagar-Gussmethode auf die richtig (s. Plan) beschrifteten Platten gegossen. Anschließend werden die Platten gemäß ihrer Beschriftung im UV-Stratalinker mit UV-Licht bestrahlt und danach dunkel gehalten, um die Photoreaktivierung inaktiv zu halten.

Versuch 2:

Pro Gruppe werden vier Eppis ausgegeben, von denen 2 mit 10 μ l Benzo(a)pyren in DMSO und die anderen 2 mit 10 μ l „nur“ DMSO befüllt sind. Diese werden entsprechend dem Plan (Skript, S. 28 unten) mit 500 μ l Phosphatpuffer bzw. Rattenleber-

extrakt und 100µl der TA98-Bakteriensuspension versetzt. Nach 30minütiger Inkubation der Mischungen im Schüttelheizblock werden selbige zum MM-A Weichagar gegeben, gevortext und auf die entsprechenden MM-A Platten gegossen.

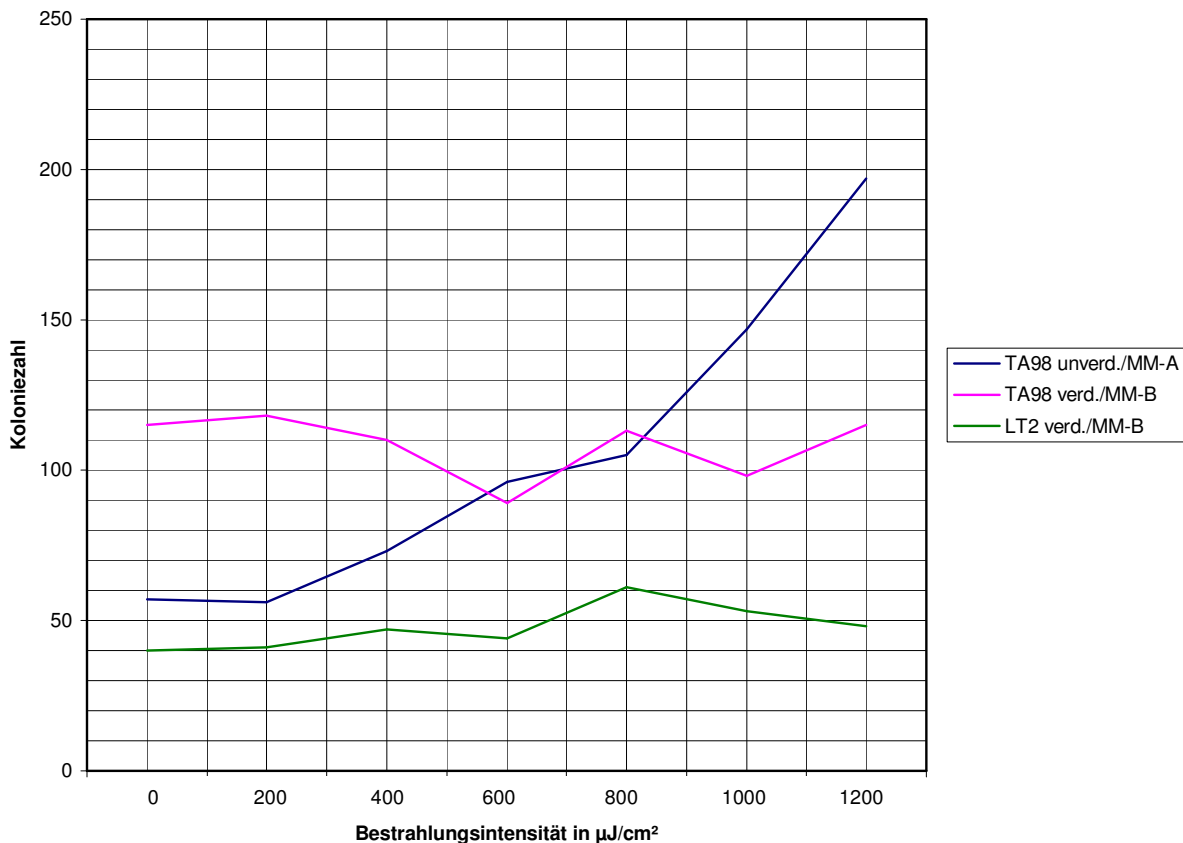
Die Platten aus beiden Versuchen werden den Betreuern zur Inkubation bei 37°C im Brutschrank übergeben.

4) Ergebnisse und Diskussion

Versuch 1: Auszählung der Kolonien

Bestrahlung im Strahlener [µJ/cm ²]	keine	200	400	600	800	1000	1200
a) TA98 unverd./MM-A	1 57	2 56	3 73	4 96	5 105	6 147	7 197
b) TA98 10 ⁻⁶ /MM-B	8 115	9 118	10 110	11 89	12 113	13 98	14 115
c) LT2 10 ⁻⁶ /MM-B	15 40	16 41	17 47	18 44	19 61	20 53	21 48

Graphische Darstellung:



Zu a) – entspricht in der graphischen Darstellung der blauen Linie:

Die Rückmutationsrate steigt mit steigender Beleuchtungsstärke. (Es wachsen auf dem MM-A Agar (ohne Histidin) ja nur solche Bakterien, bei denen eine Rückmutation von his⁻ nach his⁺ stattgefunden hat.) Eigentlich sollte bei einer Strahlungsintensität von mehr als 600 µJ/cm² die sog. kritische Grenze erreicht sein, bei der die UV-Strahlung zu viele, nicht überlebensfähige Mutanten bewirkt; bei 1200 µJ/cm² sollte der Wert eigentlich sogar fast bis auf Null sinken.

Da das hier nicht der Fall ist, kann man die, bis zur maximalen Strahlungsintensität ansteigenden Revertanzahlen dadurch erklären, dass man annehmen muss, dass die UV-Lampen schon etwas älter waren und vielleicht nur noch die halbe Leistung gebracht haben.

Zu b) – entspricht in der graphischen Darstellung der rosa Linie:

Diese Versuchsreihe sollte eigentlich aufzeigen, dass UV-Strahlung letal wirkt. Hier wurde Agar mit Histidin verwendet, so dass nicht nur die Revertanten des Stamms wachsen. Der TA98-Stamm ist, wie oben schon beschrieben, defekt für Exzisionsreparatur (UvrB-Mutante) und kann so die von der UV-Strahlung verursachten Schäden nicht mehr so fehlerfrei reparieren.

Da der Versuch keine Abnahme der Koloniezahlen mit steigender Strahlungsintensität zeigt, muss angenommen werden, dass die Lampen nicht genug Leistung, zumindest aber nicht die letale Dosis gebracht haben.

Zu c) – entspricht in der graphischen Darstellung der grünen Linie:

Die Werte sollten und bleiben hier auch relativ konstant, da der Wildtyp über Exzisionsreparatur die, von der UV-Strahlung verursachten Schäden fehlerfrei reparieren kann (natürlich auch nur bis zu einer gewissen Strahlungsstärke...) und durch das Reparatursystem vor Schädigung durch UV-Strahlung besser geschützt ist

Versuch 2: Auszählung der Kolonien

Puffer + DMSO	Platte 22 (MM-A)	54
S9 + DMSO	Platte 23 (MM-A)	96
Puffer + Benzo(a)pyren	Platte 24 (MM-A)	55
S9 + Benzo(a)pyren	Platte 25 (MM-A)	370

Dieser Versuch zeigt, dass das Benzo(a)pyren nur dann mutagen wirkt, wenn S9 Rattenleberextrakt dazugegeben wird, da das Benzo(a)pyren durch die Leberenzyme (Cytochrome) metabolisiert wird. In den anderen drei „Leerlauf-tests“ ist die Rückmutation nicht besonders erhöht.

Das Mutagen interkaliert in die DNA, so dass evtl. bei dem Stamm mit der Leserastermutation (TA98) mehr Revertanten auftreten als bei dem Stamm mit der Punktmutation (TA100).