

Kurs 2- Ames Test

Arbeitsgruppe D6:

Clara Dees

Susanne Duncker

Anja Hartmann

Kristin Hofmann

Protokoll:

Einleitung

Im heutigen Kurs haben wir den Ames Test an Salmonella-Stämmen durchgeführt. Dabei handelt es sich um einen Versuch, mit dem man relativ einfach und kostengünstig die Mutagenität von Substanzen testen kann.

In unserem ersten Teilversuch haben wir einen Wildtyp-Stamm (LT2) und einen Mutanten (TA98), welcher histidinauxotroph ist, unterschiedlich mit UV-Licht bestrahlt.

Im zweiten Teilversuch untersuchten wir die Wirkung von Benzo(a)pyren.

Material und Methoden

Bei der Vorgehensweise konnten wir uns relativ gut an unserem Skript orientieren (siehe dazu Skript S. 26 ff).

1. Teilversuch

Für das Herstellen der Verdünnungsreihe mussten wir zunächst in jedes „blue cap“ 5ml Lb-Nährmedium pipettieren.

In das erste füllten wir dann 1 ml unseres Salmonella-Stammes TA98 (im weiteren Verlauf auch nur noch als solcher bezeichnet). Anschließend wurde es gevortext. Von dieser Mischung entnahmen wir mit der 200 µl Pipette 0,05 ml und pipettierten dies in das zweite „blue cap“. So erhielten wir die Verdünnungsstufe 10^{-2} . Diesen Vorgang wiederholten wir, bis wir die Verdünnungsstufe 10^{-6} erreicht hatten.

Nach jedem Mischvorgang wurde gevortext.

Für den weiteren Versuch wurden 100 µl der TA98 zu je 3 ml bei 50 °C flüssig gehaltenem Weichagar pipettiert. Nun musste diese Suspension rasch gevortext und auf eine entsprechende Platte gegossen und durch leicht kreisende Bewegungen (Weichagargußmethode) verteilt werden, da der Weichagar sehr schnell wieder fest wird.

Nachdem der Weichagar sich gefestigt hatte, wurden die Platten der Anleitung im Skript (siehe S.28) entsprechend von uns bestrahlt und sofort danach dunkel gehalten, um eine mögliche Photoreaktivierung zu vermeiden. Dabei repariert das Enzym Photolyase defekte Stellen durch Absorption von Licht.

2. Teilversuch

Dafür mischten wir gemäß der Tabelle auf Seite 28 unten (siehe Skript) in Eppendorf-reagenzröhrchen 100 µl TA98, 500 µl Phosphatpuffer oder Rattenleberextrakt und 10 µl Benzo(a)pyren oder DMSO. Diese Mischungen wurden dann für 30 min im Schüttelheizblock inkubiert.

Nach dieser Wartezeit konnten diese zu unserem schon vorbereiteten Weichagar in den entsprechenden Röhrchen gegeben, gevortext und auf Platten nach der Weichagargußmethode verteilt werden.

Auswertung

Teilversuch 1

Bestrahlung	keine	200	400	600	800	1000	1200
TA98 MM-A	1	2	3	4	5	6	7
TA98, 10 ⁻⁶ MM-B	8	9	10	11	12	13	14
LT2, 10 ⁻⁶ MM-B	15	16	17	18	19	20	21

MM-A: Histidinfreies Medium

MM-B: Medium mit Histidin

Durch Auszählen erhielten wir folgende Ergebnisse:

Bestrahlung	I keine	II 200	III 400	IV 600	V 800	VI 1000	VII 1200
TA98 MM-A	39	165	69	28	46	50	53
TA, 10 ⁻⁶ MM-B	62	20	26	10	103	28	29
LT2, 10 ⁻⁶ MM-B	153	194	167	146	146	148	162

I.

Hier erfolgte keine Bestrahlung

Im histidinfreien Medium konnten die Salmonella TA98 nur schlecht wachsen. Stellte man TA98 Histidin im Medium zur Verfügung, so kann man eine mittelmäßig starke Vermehrung beobachten. Der Wildtyp wuchs auf histidinhaltigem Medium erwartungsgemäß am besten. Den Wachstum des Mutanten auf der histidinfreien Platte kann man durch spontane Mutationen erklären.

II.

Bei einer Bestrahlung von $200 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ kann man bei TA98 eine Reversion feststellen.

Die Salmonellen konnten sich besser vermehren als diejenigen, denen Histidin im Nährmedium zur Verfügung gestellt wurde, jedoch nicht so gut wie der Wildtyp, da bei diesem von vornherein alle Salmonella dazu in der Lage sind, Histidin selbst herzustellen. Bei Platte 2 kann man nun ja nicht voraussetzen, dass alle rückmutiert haben.

III-VII

-Erhöht man nun jedoch die Strahlung, nimmt nicht proportional dazu die Reversion und damit die Vermehrung der Salmonella zu. Bei $600 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ hat sie ihr Minimum erreicht und pendelt sich danach bei ca. 50 gezählten Kolonien ein.

- Beim Mutanten, dem man das histidinhaltige Medium angeboten hat, sinkt die Zahl der gebildeten Kolonien bei $600 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ sogar auf 10 ab. Bei $800 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ steigt sie ungewöhnlich hoch auf 103 an, um sich schließlich bei einem Wert um die 30 einzupendeln.

-der Wildtyp erreicht sein Maximum bei einer Bestrahlung von $400 \mu\text{J}/\text{cm}^2$. Erhöht man die Strahlung, so pendelt sich der Wert bei 140 Kolonien ein. Er steigt jedoch wieder bei einer Bestrahlungsstärke von $1200 \mu\text{J}/\text{cm}^2$.

Teilversuch 2

	S9 Leberhomogenisat	Benzo(a)pyren
22 (MM-A)	-	-
23 (MM-A)	+	-
24 (MM-A)	-	+
25 (MM-A)	+	+

“-”: es wurde Phosphatpuffer oder DMSO verwendet

“+”: es wurde S9 Leberhomogenisat oder Benzo(a)pyren verwendet

Hier erhielten wir durch Auszählen folgende Werte:

	Zusammensetzung s.o.
22 (MM-A)	49
23 (MM-A)	61
24 (MM-A)	36
25 (MM-A)	539

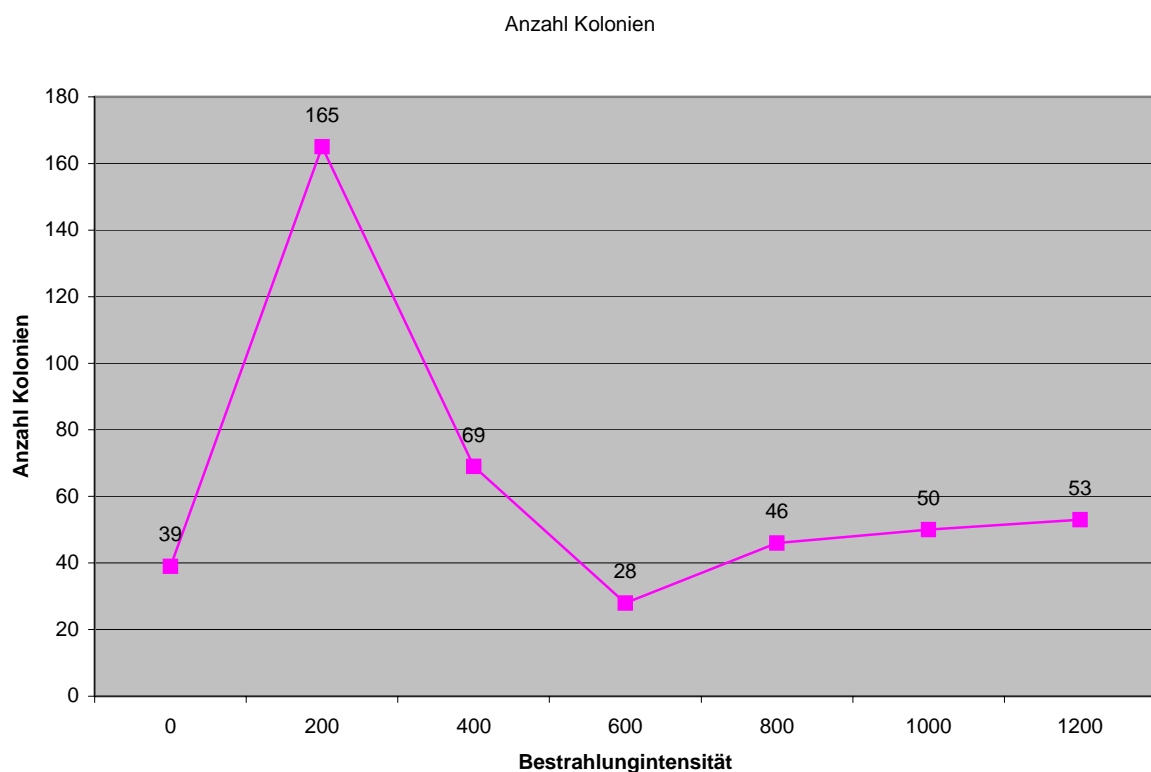
Aus diesen erhalten Werten kann man nun einige Schlussfolgerungen ziehen:

Die Platten 22-24 dienen nur als Kontrollmöglichkeit. Wirklichen Aufschluss über die Mutagenität von Benzo(a)pyren konnten wir nur mit Hilfe von Platte 25 erhalten.

Hier lässt sich nun feststellen, dass Benzo(a)pyren eine sehr mutagene Wirkung hat. Sehr viele Salmonella Stämme sind rückmutiert und konnten daher selbst im histidinfreien Medium sich vermehren und somit Kolonien bilden.

An dieser Stelle sei kurz noch einmal erwähnt, dass die von uns eingesetzten Mutanten nicht in der Lage sind, selbst Histidin herzustellen. Sie müssen es aus Ihrem Nährmedium aufnehmen können, da es sich bei Histidin um ein für sie lebensnotwenige Aminosäure handelt.

Grafische Ermittlung des Optimums der Revertantenbildung nach Bestrahlung mit UV-C



Grafischer Vergleich der Absterberaten von TA98 und LT2

