

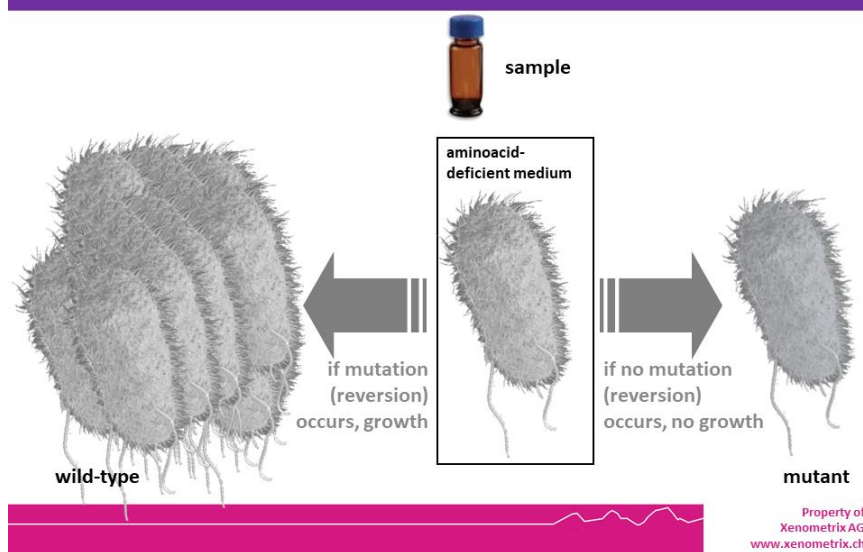
Zminiaturyzowany test Amesa

Zminiaturyzowany test Amesa - zasada

Zasada zminiaturyzowanych testów Amesa jest identyczna jak w teście Amesa OECD 471 opartym na agarze. W operonie histydynowym (*Salmonella typhimurium*) lub tryptofanie (*Escherichia coli*) dokonano mutacji punktowych, przez co bakterie nie są w stanie wytworzyć odpowiedniego aminokwasu. W wyniku tych mutacji powstają organizmy his- lub trp-, które nie mogą rosnąć bez dostarczenia histydyny lub tryptofanu.

Potencjał mutagenny badanej próbki ocenia się, wystawiając te organizmy wymagające aminokwasów na działanie różnych stężeń próbek i wybierając przypadek powrotu. Pożywki pozbawione histydyny lub tryptofanu są używane do tej selekcji, które pozwalają tylko tym komórkom, które przeszły powrót do prototrofii histydyny / tryptofanu, przeżyć i rosnąć. Zdarzenie mutagenne (powodujące substytucje zasad lub mutacje przesunięcia ramki odczytu) w obrębie genu może spowodować powrót do prototrofii aminokwasów. Te odwrócone bakterie będą następnie rosły w pożywkach pozbawionych odpowiednio histydyny lub tryptofanu, podczas gdy bakterie nieodwrócone nie będą w stanie rosnąć. Pożywka w fazie wzrostu może być płynna lub na bazie agaru.

Miniaturized Ames



Różne formy zminiaturyzowanych systemów testowych Amesa

Zminiaturyzowany test Amesa „Ames MPF™” oparty na technologii ciekłych mikroplitek - 55 mg badanego związku na 5 szczepów, +/- S9

Miniaturyzowany test Amesa „MicroAmes24” oparty na 24-dołkowej płytce agarowej - 30 mg badanego związku na 5 szczepów, +/- S9

Ultra-miniaturyzowany test Amesa „NanoAmes™” oparty na 25 kwadratowych płytkach agarowych - 35 ug badanego związku na 5 szczepów, +/- S9

Ultra-zminiaturyzowany test Amesa „NanoAmes™ MPF” oparty na opracowywanej technologii ciekłych mikroplitek.

Miniaturowy test Amesa na płytkach agarowych - opis testu

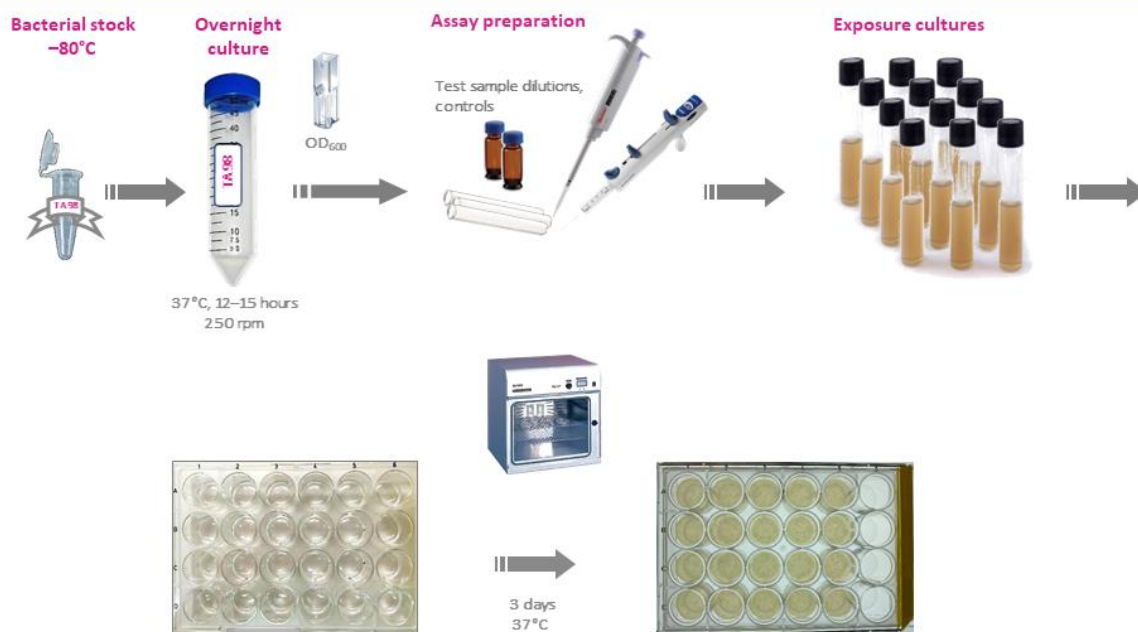
Bakterie wystawia się na różne i niskie stężenia badanej próbki, a także na kontrolę pozytywną i negatywną w pożywce zawierającej ograniczone ilości histydyny (*S. typhimurium*) lub tryptofanu (*E. coli*), aby podtrzymać w przybliżeniu dwa podziały komórek. Po ekspozycji (test przed inkubacją) lub bez ekspozycji (test włączenia płytki), hodowle w każdych warunkach (kontrola negatywna, próbki badane i kontrole pozytywne) wylewa się na podłoże agarowe na płytkach wielodołkowych (płytki 24-studzienkowe) i inkubuje. Zmniejszając powierzchnię (w porównaniu do szalki Petriego), ilość próbki testowej potrzebnej do przeprowadzenia testu jest dramatycznie zmniejszona, przy jednoczesnym zachowaniu podobnych granic wykrywalności.

W ciągu trzech dni komórki, które przeszły powrót do prototrofii aminokwasów, będą rosnąć i tworzyć kolonie, których liczby zostaną porównane z tymi, które wyrosły w dołkach z rozpuszczalnikiem (kontrola negatywna). Każda dawka jest testowana w trzech powtórzeniach, aby umożliwić analizę statystyczną danych.

Zależny od dawki i znaczący wzrost liczby kolonii powracających po ekspozycji na próbkę badaną w stosunku do kontroli rozpuszczalnika wskazuje, że próbka jest mutagenna.

Potencjał mutageny próbek jest oceniany bezpośrednio, związki są badane pod nieobecność i przy obecności aktywacji metabolicznej, zapewnionej przez homogenat wątroby, supernatantu post-mitochondrialnej frakcji wątrobowej S9, odpowiednio.

MicroAmes on 24 Well Plates – Agar Format



Zminiaturyzowany test Amesa w cieczy Format mikro płytki 384-dołkowej - opis testu

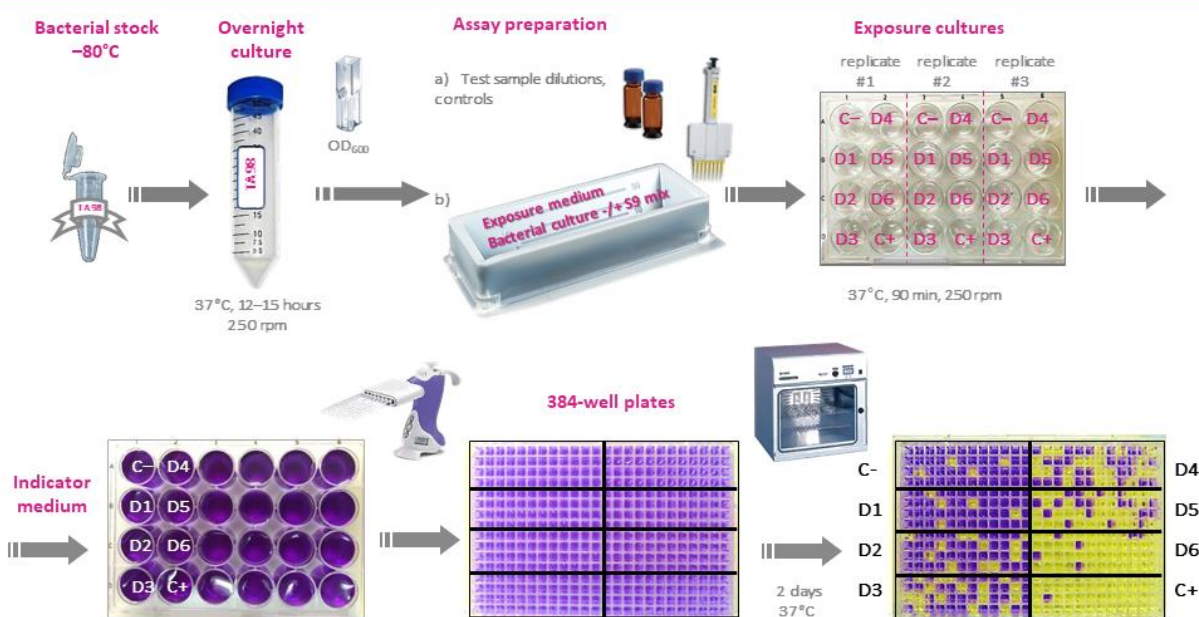
Bakterie poddaje się działaniu 6 stężeń próbki testowej, a także kontroli pozytywnej i negatywnej, przez 90 minut w pożywce zawierającej wystarczającą ilość histydyny (*S. typhimurium*) lub tryptofanu (*E. coli*), aby podtrzymać w przybliżeniu dwa podziały komórek. Po ekspozycji hodowle w każdych warunkach (kontrola negatywna, próbki badane i kontrole pozytywne) rozcieńcza się w pożywce wskaźnikowej pH bez histydyny lub tryptofanu i rozdziela do 48 dołków 384-dołkowej płytki.

W ciągu dwóch dni komórki, które przeszły powrót do prototrofii aminokwasów, będą rosnąć. W płynnym systemie Ames II / Ames MPF, metabolizm bakterii obniża wartość pH pożywki, zmieniając kolor studzienki, w której znajdują się bakterie. Liczba dołków zawierających kolonie powrotne jest liczona dla każdej dawki i porównywana z rozpuszczalnikiem (kontrola negatywna). Każda dawka jest testowana w trzech powtórzeniach, aby umożliwić analizę statystyczną danych.

Zależny od dawki i znaczący wzrost liczby kolonii powracających po ekspozycji na próbkę badaną w stosunku do kontroli rozpuszczalnika wskazuje, że próbka jest mutagenna.

Potencjał mutagenny próbek jest oceniany bezpośrednio, związki są badane w obecności aktywacji metabolicznej zapewnianej przez homogenat wątroby – frakcję wątrobową S9.

Ames MPF on 384 Well Plates - Liquid Format



Zminiaturyzowane szczepy testu Ames - genotypy

Szczepy testowe *E. coli* Ames, a także szczepy testowe *S. typhimurium* Ames są używane od ponad 40 lat do wykrywania związków mutagennych w chemikaliach, farmaceutykach, poliklinikach, biocydach, wodzie i innych próbkach środowiskowych. Wszystkie są wymienione w wytycznych OECD 471: Bacterial Reverse Mutation Test oraz w wytycznej ICH M7 dla zanieczyszczeń genotoksycznych. W operonie histydynowym (*Salmonella typhimurium*) lub tryptofanowym (*Escherichia coli*) dokonano mutacji punktowych, powodując, że bakterie nie są w stanie wytworzyć odpowiedniego aminokwasu. W wyniku tych mutacji powstają organizmy his- lub trp-, które nie mogą rosnąć bez dostarczenia histydyny lub tryptofanu.

Potencjał mutageny badanej próbki ocenia się wystawiając te organizmy wymagające aminokwasów na różne stężenia próbki i wybierając przypadek powrotu. Pożywki pozbawione histydyny lub tryptofanu są używane do tej selekcji, które pozwalają tylko tym komórkom, które przeszły powrót do prototrofii histydyny / tryptofanu, przeżyć i rosnąć. Zdarzenie mutagenne powodujące substytucje zasad lub mutacje przesunięcia ramki w genie może spowodować powrót do prototrofii aminokwasów. Te odwrócone bakterie będą następnie rosły w pożywkach pozbawionych odpowiednio histydyny lub tryptofanu, podczas gdy bakterie nieodwrócone nie będą w stanie rosnąć. Pożywka w fazie wzrostu może być płynna lub na bazie agaru

Szczepy *E. coli* WP2 pKM [101] są stosowane w teście Amesa na bazie agaru, w zminiaturyzowanym teście Amesa (MicroAmes24) i w formie płynnej (Ames MPF). Szczepy są używane zgodnie z wytycznymi OECD471, ICH M7.

Strain	Mutation	Type ^a	Target	Cell Wall ^b	Repair ^c	pKM101 ^d
<i>S. typhimurium</i>						
TA98	<i>hisD3052</i>	frameshifts	GCGCGCGC	<i>rfa</i>	<i>uvrB</i>	yes
TA100	<i>hisG46</i>	BP subst.	GGG	<i>rfa</i>	<i>uvrB</i>	yes
TA1535	<i>hisG46</i>	BP subst.	GGG	<i>rfa</i>	<i>uvrB</i>	no
TA1537	<i>hisC3076</i>	frameshifts	+1 frameshift	<i>rfa</i>	<i>uvrB</i>	no
TA97a	<i>hisD6610</i>	frameshifts	GGGGGG	<i>rfa</i>	<i>uvrB</i>	yes
<i>E. coli</i> WP2						
<i>uvrA</i> [pKM101]	<i>trpE65</i>	BP subst. ^e	A:T	–	<i>uvrA</i>	yes
<i>uvrA</i>	<i>trpE65</i>	BP subst. ^e	A:T	–	<i>uvrA</i>	no
pKM101	<i>trpE65</i>	BP subst. ^e	A:T	–	–	yes

^a: “BP subst.”: base-pair substitution.

^b: The *rfa* mutation leads to a defective lipopolysaccharide (LPS) layer that coats the cell surface, making the bacteria more permeable to bulky chemicals and non-pathogenic (Mortelsmans and Zeiger. 2000. *Mutat Res.* 455:29–60).

^c: The *uvrB/uvrA* deletion mutations eliminate the accurate excision repair mechanism, thereby allowing more DNA lesions to be repaired by error-prone DNA repair mechanisms.

^d: This R factor plasmid pKM101 enhances chemical and UV-induced mutagenesis via an error-prone recombinational DNA repair pathway. The plasmid also confers ampicillin resistance.

^e: Also cross-linking mutagens.